

NACHWEIS DER IDENTITÄT VON MALONYL- UND
PALMITYLTRANSFERASE UND IHRER LOKALI-
SIERUNG IN DER FETTSÄURESYNTHETASE AUS
HEFE

Hansjörg Engeser

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

NACHWEIS DER IDENTITÄT VON MALONYL- UND PALMITYLTRANSFERASE
UND IHRER LOKALISIERUNG IN DER FETTSÄURESYNTHETASE AUS HEFE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität

München



vorgelegt
von
Hansjörg Engeser

München 1978



1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 3.3.1978

Die vorliegende Arbeit wurde von September 1974 bis Januar 1978 auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. F. Lynen am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, ausgeführt.

Herrn Professor Dr. F. Lynen danke ich herzlich für das Interesse und die Unterstützung, die er dieser Arbeit und mir persönlich jederzeit zuteil werden ließ.

Fräulein K. Hübner und Fräulein J. Straub danke ich für ihre ausgezeichnete, zuverlässige und geschickte Mitarbeit seit November 1975 bzw. Oktober 1976.

Der Max-Planck-Gesellschaft und Herrn Professor Dr. F. Lynen danke ich sehr herzlich dafür, daß sie mir die Teilnahme am EMBO Protein Sequencing Course 1976 unter Leitung von Frau Dr. A. Henschen-Edman, Herrn Professor Dr. K. Kühn und Herrn Professor Dr. P. Edman ermöglicht haben.

Herrn F. Wieland gilt mein Dank für Zusammenarbeit bei den im Kapitel 5 dargestellten Versuchen.

Weiterhin möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen, die in irgendeiner Weise zu dieser Arbeit beigetragen haben, an dieser Stelle danken.

INHALTSVERZEICHNIS	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Organisation und Mechanismus der Fettsäurebiosynthese	1
1.2. Malonyl-CoA in der Fettsäurebiosynthese - die Malonyltransferase	4
1.3. Die terminale Reaktion der Fettsäurebiosynthese	6
2. Stöchiometrische und funktionelle Zusammenhänge zwischen den Transferasen	8
2.1. Blockierung von SH-Gruppen, Testprinzipien	8
2.2. Einfluß der DTNB Inkubation	9
2.3. Beladungszahl der Malonyltransferase (Testprinzip 1)	10
2.4. Spezifität der Beladung	12
2.5. Palmityl-CoA-Einfluß auf die Malonylbeladung	14
2.6. Beladungszahl der Palmityltransferase (Testprinzip 1)	16
2.7. Hemmung der Palmityltransferase	18
2.8. Reaktion mit Acetyl-, Malonyl-, und Palmityl-CoA (Testprinzip 2)	23
2.9. Diskussion	29
3. Peptidchemische Charakterisierung der Malonyltransferase	30
3.1. Isolation von ^{14}C -Malonylpeptiden	30
3.1.1. Markierung der Akzeptorgruppe - Wahl der Protease	30
3.1.2. Denaturierungsbedingungen - Carboxymethylierung	31
3.1.3. Tryptische Spaltung	32
3.1.4. Gelchromatographie	33

	Seite
3.1.5.	Ionenaustauschchromatographie 34
3.1.6.	Hochspannungspapierelektrophorese - Aminosäurezusammensetzung 34
3.1.7.	Aufarbeitung des tryptischen "Cores" 40
3.1.8.	Diskussion 44
3.2.	Strukturermittlung 46
3.2.1.	N-terminale Analyse 46
3.2.2.	Sequenzierung von IIa mit Carboxypeptidase 47
3.2.3.	Thermolysinfragmentierung - die Natur der Akzeptorgruppe 49
3.2.4.	Edman-Abbau von IIa Th III - die Struktur von IIa 51
3.2.5.	Sequenzierung von Peptid I mit CPY 53
3.2.6.	Protease-V-8-Fragmentierung - Fragmentisolation 54
3.2.7.	Struktur von Peptid IIb 59
3.2.8.	Zum Mechanismus der Acylumlagerung 59
3.2.9.	Diskussion 61
4.	Peptidchemische Charakterisierung der Palmityl- transferase 63
4.1.	Allgemeines 63
4.2.	Markierung der Akzeptorgruppe -Probenvorbereitung - Tryptische Spaltung 64
4.3.	Peptische Spaltung des "Cores" 65
4.4.	Hochauflösende Hochdruckflüssigkeitschromato- graphie 65
4.5.	Isolation des Palmitylpeptids 67
4.6.	Festphasen-Edmanabbau 69
4.7.	Sequenz des Palmitylpeptids 72
4.8.	Zur Existenz einer doppelspezifischen Malonyl- Palmityl-Transferase 78

5.	Entwicklung eines analytischen Gel-Elektrophoresesystems zur Trennung von Proteinuntereinheiten	83
5.1.	Erschöpfende chemische Modifizierung - Homogenitätsnachweis	83
5.2.	Proteinchemische Lokalisierung der Acetyl-, Malonyl- und Palmityltransferase	89
5.3.	Allgemeine Anwendung des Verfahrens	91
5.4.	Diskussion	97
6.	Weitere Untersuchungen an FSS	98
6.1.	Reaktion mit NEM, Beladungshöhe und Inaktivierung	99
6.2.	Barrierefunktion der Malonyltransferase	101
6.3.	Reaktion mit gruppenspezifischen Reagenzien	104
6.3.1.	Reaktion mit Phenylglyoxal	104
6.3.2.	Einfluß von serinproteasenspezifischen Reagenzien	106
6.3.3.	Photoxidation	107
6.3.4.	Lactoperoxidase-Reaktion	108
6.4.	Zusammenfassung	110
7.	Experimenteller Teil	111
7.1.	Allgemeines	111
7.1.1.	Verwendete Geräte	111
7.1.2.	Materialien	112
7.1.3.	Verzeichnis verwendeter Lösungs- und Lauf- mittelsysteme	114
7.1.4.	Allgemeine analytische Methoden	115

7.1.4.1.	Proteinbestimmung	115
7.1.4.2.	Radioaktivitätsmessung	115
7.1.4.3.	Autoradiographie	116
7.1.4.4.	Isolierung und Aktivitätsbestimmung von FSS	116
7.2.	Versuchsbeschreibung zu Kapitel 2	116
7.2.1.	Synthese und Reinigung von 3- ¹⁴ C-Malonyl-CoA	116
7.2.2.	Radioaktive Acylbeladung (Testprinzip 1, 2.1.)	117
7.2.2.1.	DTNB-Behandlung	117
7.2.2.2.	Inkubation mit 3- ¹⁴ C-Malonyl-CoA	117
7.2.2.3.	Inkubation mit ¹⁴ C-Palmityl-CoA	117
7.2.2.4.	Abtrennung von Acyl-CoA durch Waschung	118
7.2.2.5.	Abtrennung von Acyl-CoA durch Ionenaustausch- chromatographie	118
7.2.3.	Spezifität der Beladung	119
7.2.4.	Der Palmityltransferasetest	120
7.2.5.	Acylbeladung von FSS (Testprinzip 2, 2.1.)	121
7.3.	Versuchsbeschreibung zu Kapitel 3	122
7.3.1.	Radioaktive Markierung der Akzeptorgruppe	122
7.3.2.	Reduktion und	122
7.3.3.	Carboxymethylierung	122
7.3.4.	Abtrennung von Reagenzien	123
7.3.5.	Tryptische Spaltung von ¹⁴ C-Malonyl-CoA-FSS	123
7.3.6.	Gelchromatographie	124
7.3.7.	Ionenaustauschchromatographie an Whatman DE 52	124
7.3.8.	Hochspannungspapierelektrophorese	125
7.3.9.	HCl-Hydrolyse (165)	126
7.3.10.	Aminosäureanalyse	126
7.3.11.	Endgruppenanalyse	127
7.3.12.	Verdauung mit Leucinaminopeptidase (171)	128
7.3.13.	Sequenzanalyse mit Carboxypeptidase Y	129
7.3.14.	Thermolysinfragmentierung des Peptids IIA	130
7.3.15.	Dünnschichtchromatographie	130
7.3.16.	Protease-V-8-Fragmentierung	131
7.3.17.	Dünnschichtelektrophorese	131
7.3.18.	Edman-Abbau der Peptide IIA ThIII und I-V-8-I	132
7.3.19.	Identifizierung von PTH-Aminosäuren	132
7.3.20.	Reduktive Hydrolyse (76)	133
7.4.	Versuchsbeschreibung zu Kapitel 4	133

7.4.1.	Radioaktive Markierung der Akzeptorgruppe	133
7.4.2.	Reduktion und Carboxymethylierung	133
7.4.3.	Tryptische Spaltungen	134
7.4.4.	Pepsinspaltung des unlöslichen Rückstands, Butanolextraktion	134
7.4.5.	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	135
7.4.6.	Endgruppenanalyse, CPY-Reaktion, Dünnschicht- chromatographie der Nebenkompente	135
7.4.7.	Festphasenedmanabbau	135
7.4.7.1.	Reinigung der Lösungsmittel	135
7.4.7.2.	Vorbereitung des Harzes (105)	136
7.4.7.3.	Ankopplung (105)	136
7.4.7.4.	Blockierung überschüssiger Aminogruppen des Trägers (106)	136
7.4.7.5.	Edman-Abbau unter wasserfreien Bedingungen	136
7.4.8.	Identifizierung	138
7.5.	Versuchsbeschreibung zu Kapitel 5	138
7.5.1.	Erschöpfende chemische Modifizierung -allgemeines Verfahren	138
7.5.1.1.	Denaturierung, Reduktion	138
7.5.1.2.	Carboxymethylierung (s. 7.3.2.)	138
7.5.1.3.	Citraconylierung	138
7.5.1.4.	Bestimmung freier NH_2 - und SH-Gruppen	138
7.5.2.	Radioaktive Markierung der Transferasen und der Untereinheit α	139
7.5.2.1.	1- ^{14}C -Acetyl-CoA-Inkubation	139
7.5.2.2.	3- ^{14}C -Malonyl-CoA-Inkubation	139
7.5.2.3.	1- ^{14}C -Palmityl-CoA-Inkubation	139
7.5.2.4.	Markierung der Untereinheit α	139
7.5.3.	Erschöpfende chemische Modifizierung -spezielles Verfahren	140
7.5.4.	Dialyse- Harnstoffgelelektrophorese	140
7.5.4.1.	Dialyse	140
7.5.4.2.	Gelelektrophorese	140
7.6.	Versuchsbeschreibung zu Kapitel 6	141
7.6.1.	Beladung mit 2.3- ^{14}C -NEM	141
7.6.2.	Messung der Gleichgewichtskonstante	141
7.6.3.	Modifizierungsreaktionen	142
7.6.3.1.	Reaktion mit Phenylglyoxal (161)	142
7.6.3.2.	Reaktion mit TPCK, ZPCK, TLCK (136)	142
7.6.3.3.	Photooxidation (in Anlehnung an (178))	142
7.6.3.4.	Lactoperoxidasereaktion (140)	142
8.	Zusammenfassung	143
9.	Literaturverzeichnis	145

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
AcCoA	Acetyl-CoA
CoA	Coenzym A
cpm, Jpm	gezählte Zerfälle pro Minute
dpm	echte Zerfälle pro Minute
DNS-	Dansyl-, Dimethylamino-naphtalin-sulfonyl-
DMF	Dimethylformamid
DTNB	5,5'-Dithiobis(-2 nitrobezoessäure)
EDC	1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid
ΔE	Extinktionsänderung
EDTA	Äthylendiamin-Tetraessigsäure
FMN	Flavinmononucleotid, oxidiert
FMNH ₂	Flavinmononucleotid, reduziert
i.v.	im Vakuum
JAA	Jodacetamid
h	Stunde(n)
LAP	Leucinaminopeptidase
LPO	Lactoperoxidase
LM	Lösungsmittel
min	Minute(n)
NEM	N-Äthylmaleinimid
Mal-CoA	Malonyl-CoA
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotid, reduziert
PITC	Phenylisothiocyanat
PTH	Phenylthiohydantoin
PAS	Perameisensäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
TCA	Trichloressigsäure
Pyridin	<u>Acetat</u> Pyridin-Acetat-Puffer, Molarität bez. auf Acetat
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
Temed	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
PPO	2.5-Diphenyloxazol
DM-POPOP	Dimethyl-1.4-Bis-2(5-phenyloxalzol)benzol

1. EINLEITUNG

1.1. Organisation und Mechanismus der Fettsäuresynthese

Durch die Arbeiten mehrerer Gruppen während der vergangenen zwei Jahrzehnte existiert heute ein umfangreiches Wissen über die Organisation der Fettsäurebiosynthese in den verschiedensten Organismen (Übersicht s. 1-5).

Fettsäuresynthetisierende Systeme können danach in zwei Gruppen eingeteilt werden.

Die Systeme der einen Gruppe bestehen aus mehreren Enzymen niederen Molekulargewichts, die unter üblichen Verfahren der Proteinanreicherung separat isoliert werden. Diese Systeme liegen u.a. in Bakterien (*E. coli*), in Pflanzen (Avocado mesocarp) oder photoauxotroph gewachsenen eukaryontischen Algen (*Euglena gracilis*) vor. Die fettsäurebildenden Systeme der anderen Gruppen werden als mehr oder weniger stabile Multi-enzymkomplexe angereichert.

Das Molekulargewicht dieser Komplexe reicht von etwa $0.4 - 0.6 \times 10^6$ Dalton bei Insekten, Vögeln und Säugern bis zu $2-3 \times 10^6$ Dalton bei Mikroorganismen wie *Corynebacterium diphtheriae*, *neurospora crassa* oder der Hefe.

Zu den niedersten Organismen in denen Multienzymkomplexe realisiert sind, dürften *C. diphtheriae* (6) und *Mycobacterium smegmatis* (7) zählen, zu den bestverstandenen, fettsäurebildenden Systemen zählt trotz des hohen Molekulargewicht (2.3×10^6 Dalton) der stabile Multienzymkomplex der Hefe (8).

Das Studium dieses Komplexes hat grundlegende Beiträge zum Verständnis der Reaktionen geliefert, nach denen die Fettsäurebiosynthese abläuft und lieferte schon vor über 15 Jahren in prinzipiell richtiger Weise die Gesamtgleichung der Fettsäurebiosynthese Gl. 1 und eine Erkennung der beteiligten Teilreaktionen (9).

Hiernach wird ein Acetylrest von Acetyl-CoA auf die sogenannte zentrale SH-Gruppe übertragen und gelangt von dort auf die sogenannte periphere SH-Gruppe, die SH-Gruppe eines Cysteins im aktiven Zentrum des kondensierenden Teilenzym.

Im nächsten Schritt wird ein Malonylrest von Malonyl-CoA auf die wieder frei gewordene zentrale SH-Gruppe übertragen. Diese Gruppe ist Teil des 4'-Phosphopantetheins, der prosthetischen Gruppe des integrierten Acyl Carrier Proteins (ACP). Die über das 4'-Phosphopantethein vermittelte kovalente Verankerung von Intermediaten an den Multienzymkomplex erlaubt kraft der Länge ($20 \text{ \AA}$) (10) und Flexibilität der prosthetischen Gruppe den Kontakt mit verschiedenen aktiven Zentren des Multienzymkomplexes, schirmt den Biosyntheseprozess gegen Seitenreaktionen ab und beschleunigt ihn durch Erhöhung der stationären Konzentration der Intermediate (11).

In einer Reaktion zwischen dem Acetyl- und dem Malonylrest am aktiven Zentrum des kondensierenden Enzyms wird unter Abspaltung von CO_2 ein 4'-phosphopantetheingebundener Acetoacetylrest gebildet. Dieser wird am aktiven Zentrum der β -Ketoacylreduktase durch NADPH zum β -Hydroxybutyrylrest reduziert, der am aktiven Zentrum der Dehydratase zum Crotonylrest modifiziert wird. Eine zweite Reduktion mit NADPH unter Beteiligung von FMN führt zur Bildung eines Butyrylrests, der wie im 1. Zyklus der Acetylrest auf die periphere SH-Gruppe übertragen wird. Die Aufnahme eines zweiten Malonylrests leitet einen weiteren Reaktionszyklus ein. Terminale Reaktion des Hefeenzym ist bei einer Kettenlänge von 16 oder 18 Kohlenstoffatomen die Übertragung der fertigen Fettsäure auf Coenzym A.

Angesichts der universellen Gültigkeit des Schemas ist es nicht verwunderlich, daß FSS aus Hefe modernen, mechanistischen Studien zur Stereochemie der Fettsäurebiosynthese Pate gestanden hat (12,14).

Auf spezies-spezifische Unterschiede der terminalen Reaktion wird später eingegangen werden. Verständlich ist, daß in Son-

derfällen Variationen möglich sind: So wird etwa durch Verwendung von Methylmalonyl-CoA statt Malonyl-CoA in der Uropygialdrüse der Gans die Synthese verzweigtkettiger Fettsäuren möglich, ohne daß ein Auftreten anderer Reaktionsmechanismen angenommen werden müßte (14).

Die Beteiligung gleichartiger Reaktionsmechanismen am Synthesegeschehen in verschiedenen Organismen legt nahe, daß die Architektur ihrer aktiven Zentren ähnlich ist, eine Idee, die zumindest für die 4'-Phosphopantetheinbindungsregion des ACP durch vergleichende, sequenzanalytische Studien gestützt wird (15,16,17).

Dies ist von Interesse, da genetische Analysen gezeigt haben, daß der Multienzymkomplex der Hefe (18) durch nur zwei ungekoppelte Genloci fas 1 und fas 2 kodiert wird, die die Information für nur zwei Arten multifunktionaler Polypeptidketten beinhalten. Die erwähnten Sequenzhomologien lassen vermuten, daß Prozesse der Genfusion die Organisation von Einzelenzymen zu multifunktionalen Proteinen begleitet haben (19).

Ein Teil der vorliegenden Arbeit (Kapitel 5) beschäftigt sich mit der Frage, ob das genetische Konzept von der Multifunktionalität anhand der Transferase verifiziert bzw. ausgedehnt werden kann.

1.2. Malonyl-CoA in der Fettsäurebiosynthese - die Malonyltransferase

Die in Gleichung 1 dargestellte Bruttogleichung zeigt, daß an der Fettsäurebiosynthese - im Gegensatz zum Fettsäureabbau durch β -Oxidation - Malonyl-CoA teilnimmt.

Die Beteiligung dieser Verbindung führt durch die Abspaltung von CO_2 in der Kondensationsreaktion zum vollständigen Verlauf und zur Synthese langkettiger Acyl-CoA-Verbindungen.

Historisch muß der Befund Bradys (20), daß in Leberschnitten die Bildung von Fettsäuren bicarbonatabhängig ist, der Vorschlag Lynens auf der Gordon Konferenz in Meriden (zitiert in 21), daß Malonyl-CoA aktives Intermediat ist, und der entsprechende experimentelle Befund von Brady (22) und Wakil (23) als wesentlich für die Erkennung der Synthesegleichung angesehen werden.

Interessanterweise ist ein definiertes Teilenzym, die Malonyltransferase, für die Aufnahme von Malonylresten von Malonyl-CoA in FSS aus Hefe verantwortlich (9). Weitere Transferasen sind für die Aufnahme von Acetylresten und für die Abgabe von Palmityl- oder Stearylresten ins Medium verantwortlich. Das dem Entstehen von Multienzymkomplexen in der Evolution zugrundeliegende Prinzip größtmöglicher Kompartimentierung könnte den Transferasen diejenige regulatorische Rolle zugewiesen haben, die die biologischen Membranen für Zellorganellen und ganze Zellen spielen (24).

Die frühere Annahme, die Malonyltransferase sei ein SH-Enzym (25) hat zwar in Veröffentlichungen verschiedener Labors zunächst scheinbar eine Bestätigung erfahren (26-28), jedoch haben peptidchemische Arbeiten von Schweizer - insbesondere in Kombination mit der Methode der Perameisensäureoxidation zur Unterscheidung von Thioestern und Sauerstoffestern - ergeben, daß die Malonyltransferase ein Serinenzym ist (29). Durch die Schweizer'schen Arbeiten ist die Aminosäurezusammensetzung eines Penta- und eines Heptapeptids aus dem aktiven Zentrum dieses Enzyms bekannt.

In der Zwischenzeit scheint auch gesichert zu sein, daß in den entsprechenden Enzymkomponenten des fettsäuresynthetisierenden Systems aus *E. coli* und der Taubenleber (30-33) der Malonyltransfer unter Beteiligung von Serin im aktiven Zentrum abläuft.

Wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine Ausdehnung der Befunde von Schweizer an der Malonyltransferase, nämlich die Ermittlung der Aminosäuresequenz eines Peptids aus dem aktiven Zentrum dieses Teilenzym.

Die Arbeit dient damit einer Abrundung vergleichbarer Studien über Orte kovalenter Bindung von Substraten am Multienzymkomplex, so ist etwa durch die Arbeiten von Ziegenhorn an der Acetyltransferase die Sequenz von Peptiden aus dem aktiven Zentrum dieses Teilenzym bekannt (34). Eine vergleichende Betrachtung sollte zeigen, inwieweit Peptide aus beiden Zentren homolog sind. Ein wichtigerer Aspekt der geplanten Arbeit ergibt sich jedoch aus dem im nächsten Abschnitt Geschilderten.

1.3. Die terminale Reaktion der Fettsäurebiosynthese

Als einziger Schritt in der Fettsäurebiosynthese unterliegt die terminale Reaktion speziesspezifischen Unterschieden. Das Endprodukt des E.coli-Systems ist eine ACP-gebundene Fettsäure; die Rolle zweier von Wakil isolierten Palmityl-ACP-thioesterasen (35,36) bleibt zu klären. Bei Pflanzen ist ein terminaler Thioesterase-Schritt beschrieben, der vermutlich - in Kombination mit Acyl-CoA Synthetasen - die Übertragung von Acylresten vom ACP auf Coenzym A ermöglicht, und damit die Umpolung auf diesen in den weiteren Schritten des pflanzlichen Lipidstoffwechsels bevorzugten Träger einleitet (37). In den Multienzymkomplexen aus höheren Organismen ist der terminale Schritt eine Deacylierung komplexgebundener Acylreste, eine Reaktion, die zumindest im Fall der Taubenleber- und des Gänseenzym unter Beteiligung der Aminosäure Serin im aktiven Zentrum des Teilenzym abläuft (38,39).

Ein Charakteristikum der durch Fettsäuresynthetase aus Hefe katalysierten Reaktion ist die unter physiologischen Bedingungen fast ausschließliche Bildung von Palmityl- und Stearyl-Coenzym A. In der Bildung von Thioestern des Coenzym ähnelt dem Hefeenzym der Multienzymkomplex aus *M. smegmatis*, dessen Produktspektrum jedoch bimodal ist und Kettenlängenmaxima bei 16 und 24 Kohlenstoffatomen aufweist (40).

Das Zustandekommen des Produktspektrum von Fettsäuresynthetase aus Hefe läßt sich unter der Annahme der Konkurrenz der Palmityltransferase mit der peripheren SH-Gruppe um die wachsende Acyl-

verbindung deuten, eine Vermutung, die durch experimentelle Befunde Sumpers eindrucksvoll bestätigt wird (40).

Interessanterweise haben peptidchemische Arbeiten von Ayling ergeben, daß die Aminosäurezusammensetzung eines Peptides aus dem aktiven Zentrum der Palmityltransferase identisch ist mit der Aminosäurezusammensetzung des oben erwähnten, von Schweizer isolierten Heptapeptides aus dem aktiven Zentrum der Malonyltransferase (41).

Falls die identische Aminosäurezusammensetzung Zufall wäre, so wäre der Ayling'sche Befund belanglos. Falls nicht nur die Zusammensetzung, sondern auch die Sequenz der Aminosäuren identisch wäre, so würde dagegen die Identität der aktiven Zentren von Malonyl- und Palmityltransferase in dem Bereich des Möglichen rücken, was eine mechanistische Fortführung des Sumpermodelles bedeuten würde.

Eine Partialsequenz eines Peptides aus dem aktiven Zentrum der Palmityltransferase liegt zu Beginn dieser Arbeit vor (15,42).

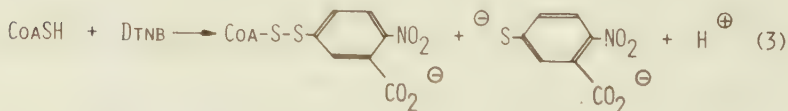
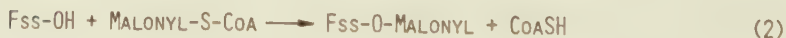
Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist damit der strukturelle Vergleich der Malonyltransferase mit der Palmityltransferase. Untersuchungen zur Klärung funktioneller Zusammenhänge im Bereich der Transferasen werden im Kapitel 2 beschrieben. Die Untersuchungen des Kapitels 4 (Isolation und Sequenz eines Palmitylpeptides) sind als logische Fortführung der Befunde von Kapitel 2 und 3 und den Widersprüchen zu früheren Arbeiten (42) zu verstehen. In Sonderkapiteln wird über weitere Charakteristika der Transferasen berichtet werden, Anlaß und Zweck wird im einzelnen zu Beginn der Abschnitte erwähnt werden.

2. Stöchiometrische und funktionelle Zusammenhänge zwischen den Transferasen

2.1. Blockierung von SH-Gruppen, Testprinzipien

Das selektive Studium der Acylbindungsstellen der Transferasen wird durch die Blockierung der zentralen und peripheren SH-Gruppen erleichtert. Nach Untersuchungen von Ziegenhorn (34) wird die Acetyl-, Malonyl- oder Palmityltransferasereaktion durch Behandlung von Fettsäuresynthetase mit 10^{-2} M N-Äthylmaleinimid (NEM) nicht beeinträchtigt. Auch die Reaktion von Fettsäuresynthetase mit 5,5'-Dithio-bis (-2-nitro-benzoesäure) (DTNB) zur Blockierung reaktiver SH-Gruppen wird mehrfach beschrieben (43,10).

Nach Messungen von Sumper treten bei Inkubation von Fettsäuresynthetase mit DTNB spontan 5-10 SH-Gruppen in Reaktion, gefolgt von der langsamen Reaktion weiterer SH-Gruppen. Nach Blockierung dieser Gruppen verläuft die Reaktion mit Acyl-CoA-Substraten gemäß Gleichung 2, 3:



Bei Beladung des Enzyms wird CoA-SH frei, das gemäß Gleichung 3 in quantitativer Weise mit im Überschuß vorhandenem DTNB abreagiert. Triebkraft der Reaktion ist die Bildung eines stabilen Thiophenolat-Anions, das bei 405 nm ein Absorptionsmaximum besitzt (44,43).

Die Beladungszahl, das heißt die Zahl der pro Molekül Fettsäuresynthetase aufgenommenen Acylgruppen kann anhand von Gleichung 3 optisch gemessen werden (Testprinzip 2) oder - bei Verwendung radioaktiver Acyl-CoA Substrate - anhand Gleichung 2, durch Bestimmung der proteingebundenen Radioaktivität (Testprinzip 1).

Diese Zahl ist aus mindestens zwei Gründen von Interesse,

1. Sie liefert Information über die Anzahl der von Thiolgruppen unabhängigen Acylbindungsstellen⁺ und in Verbindung mit peptidchemischen Analysen Information über die Mindest-Zahl identischer Kopien dieser Transferasen im Komplex.

2. Kenntnis dieser Zahl erlaubt eine Ermittlung einer Gleichgewichtskonstante für die in Gleichung 2 angegebene Reaktion.

2.2. Einfluß der DTNB-Inkubation

Da es denkbar erscheint, daß die Blockierung von SH-Gruppen mit DTNB konformative Änderungen auslöst, in deren Verlauf Nicht-thiolgruppen der Reaktion mit Substraten schwerer zugänglich werden, wird die Inkubationszeit mit 10^{-3} M DTNB variiert. Unterschiedlich lange modifizierte FSS wird mit gleichgroßen Mengen ^{14}C -Malonyl-CoA gleichlange inkubiert und die proteingebundene Radioaktivität bestimmt.

Wie aus Tab. 1 ersichtlich, ist die Beladungshöhe im Rahmen der Fehlergrenze konstant, ein allmähliches 'Verkrüppeln' von Malonyltransferasen durch Kontakt von FSS mit DTNB kann dadurch ausgeschlossen werden. Nicht auszuschließen ist dagegen eine rasche konformative oder sterische Blockierung von Transferasen im Verlauf der ersten Minuten der Reaktion mit DTNB. Derartige Effekte sind einer Messung schwerer zugänglich: Wird die DTNB Inkubation zu kurz gewählt, so kann das Substrat auch noch freie

+ Noch ohne genaue Kenntnis dieser Acylbindungsstellen werden diese im folgenden häufig als Transferasen bezeichnet.

TAB.1 EINFLUSS DER DTNB- INKUBATION AUF DIE BELADUNG DER
MALONYLTRANSFERASE

DTNB- INKUBATION: JE 3,6 MG FSS IN 0,1 M KPO_4 , PH 6,5,
 10^{-3} M DTNB, $25^{\circ}C$, 1-4 h ($V= 200 \mu L$), DANN ZUGABE VON
 10^{-4} M $3-^{14}C$ -MALONYL- CoA (6468 CPM/NMOL), 30 MIN, $0^{\circ}C$,
BESTIMMUNG DER PROTEINGEBUNDENEN RADIOAKTIVITÄT NACH
7.2.2.4.

PROBE	INKUBATIONSZEIT (10^{-3} M DTNB, $25^{\circ}C$, h)	PROTEINGEBUNDENE RADIOAKTIVITÄT [CPM]
1	1	29473
2	2	30275
3	3	29878
4	4	29378

SH-Gruppen besetzen. Dadurch würde die Stöchiometrie der Transferasebesetzung jedoch verzerrt. Nach Arbeiten von Ziegenhorn (34) bindet FSS selbst nach einstündiger Inkubation mit 10^{-3} M DTNB bei $0^{\circ}C$ Acetylreste zu 7-20 % als Thioester und zu 93-80 % als Sauerstoffester, Sumper beschreibt einen Anteil von nur 6 % perameisensäurelabiler Bindungen in ^{14}C -Acetyl-FSS, die 2 h bei Raumtemperatur mit DTNB reagiert hatte (10).

Zur Ermittlung der Beladungszahl der Malonyltransferase wird die DTNB-Beladung im folgenden nach Sumper durchgeführt und das Ergebnis als Mindestzahl interpretiert.

2.3. Beladungszahl der Malonyltransferase (Testprinzip 1)

Der zeitliche Verlauf der Reaktion ist in Abb. 2 dargestellt: DTNB-modifizierte FSS wird bei $4^{\circ}C$ mit sorgfältig gereinigtem ^{14}C -Malonyl-CoA zu einer Endkonzentration von 10^{-4} M versetzt

und 10 bis 120 Min. inkubiert. Nach Denaturierung mit Tri-chloressigsäure (TCA) und Waschung wird die proteingebundene Radioaktivität bestimmt. Da DTNB die Proteinbestimmung nach der Biuretmethode (45) stört (46), wird in Parallelansätzen DTNB-freie FSS wie oben mit TCA behandelt und zur Proteinbestimmung verwendet.

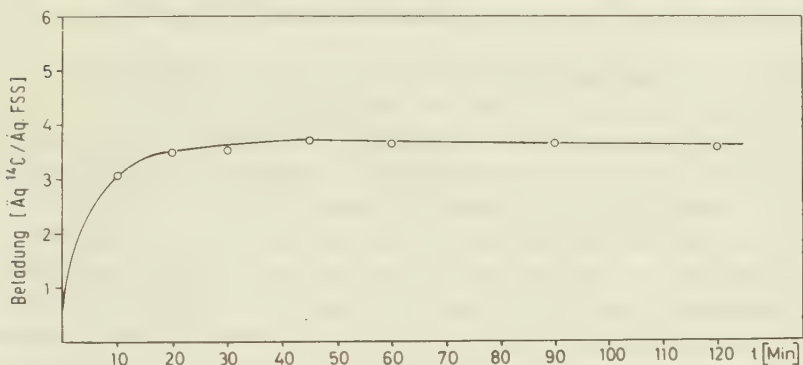


Abb. 2: Zeitlicher Verlauf der Beladung der Malonyltransferase
DTNB-Vorinkubation: 10^{-3} M, 2 h, 25° C, je 4.4 mg FSS, $V = 200 \mu\text{l}$;
 $3\text{-}^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA-Inkubation: 10^{-4} M (17008 cpm/nMol), 10-120 min, 0° C. Weitere Einzelheiten 7.2.2.1. und 7.2.2.2.

Tab. 2: Stabilität der ^{14}C -Malonyl-Protein-Bindung in Trichlor-essigsäure.

DTNB-Inkubation 10^{-3} M, 2 h, 25° C, je 3,4 mg FSS. Zugabe von 10^{-4} M $3\text{-}^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA (6468 cpm/nMol), 30 min., 0° C. TCA-Fällung. Aufarbeitung: 1 u. 2; sofort 3 u. 4 nach 24 h in TCA bei $+4^{\circ}$ C. s. 7.2.2.4.

PROBE	AUFARBEITUNG	PROTEINGEBUNDENE RADIOAKTIVITÄT [CPM]
1	SOFORT	31036
2	SOFORT	30927
3	NACH 24 h	30336
4	NACH 24 h	30353

Da sorgfältiges, verlustfreies Waschen des Proteins mit TCA einige Stunden dauert, wird in einem Experiment radioaktiv markierte FSS nach Denaturierung über 24 h in TCA inkubiert und erst dann wie oben beschrieben gewaschen und aufgearbeitet. Aus Tab. 2 ist ersichtlich, daß es in der Zeitspanne zu keiner signifikanten Abspaltung von Malonsäure kommt; die Malonylproteinbindung ist also im denaturierten Zustand säurestabil.

Die Beladung des Enzyms erreicht nach wenigen Minuten einen konstanten Maximalwert. Der Maximalwert wird bei höheren Malonyl-CoA Konzentrationen schneller erreicht als bei Konzentrationen $< 10^{-4}$ M. Die Beladungszahl wird immer als Plateauwert in Verbindung mit einer Beladungskinetik ermittelt, sie ist unabhängig von der Malonyl-CoA-Charge und dem jeweils verwendeten FSS-Präparat. Die Beladungszahl ist nur wenig höher, wenn statt der TCA-Denaturierung eine Harnstoffdenaturierung (6 M) gewählt wird und überschüssiges Malonyl-CoA nicht durch Waschen, sondern durch Ionenaustauschchromatographie entfernt wird (s. Exp. Teil 7.2.2.3.).

Damit beträgt die Mindestzahl der im radioaktiven Test ermittelten Malonylbindungsstelle ca. 4. Dieser Wert deckt sich mit früheren, vollkommen unabhängig gewonnenen Messungen (46), in denen $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA eingesetzt wurde.

Über die Zahl identischer Kopien der Malonyltransferase im Multienzymkomplex sagt diese Zahl per se nichts aus. Hierzu muß die chemische Natur der Akzeptorgruppen geklärt werden.

2.4. Spezifität der Beladung

Da DTNB durch Abfang von Coenzym A die Reaktion von FSS mit Malonyl-CoA stark in Richtung einer Beladung des Enzyms mit Malonylresten zieht, kann a priori unspezifische Beladung nicht ausgeschlossen werden. Schweizer (29) hat anhand einer Rückübertragung von Methylmalonsäure von isolierter Methylmalonyl-FSS auf CoA-SH die Spezifität der Reaktion nativer FSS mit dem arti-

fiziellen Substrat Methylmalonyl-CoA gezeigt, eine ähnliche Studie ist für die Malonyl-Coenzym A-ACP-Transacylase von E.coli beschrieben (31). Zum Studium der Spezifität der Reaktion DTNB-modifizierter FSS mit Malonyl-CoA in Gegenwart von DTNB wird Malonyl-FSS durch Gelfiltration isoliert und mit Coenzym A inkubiert.

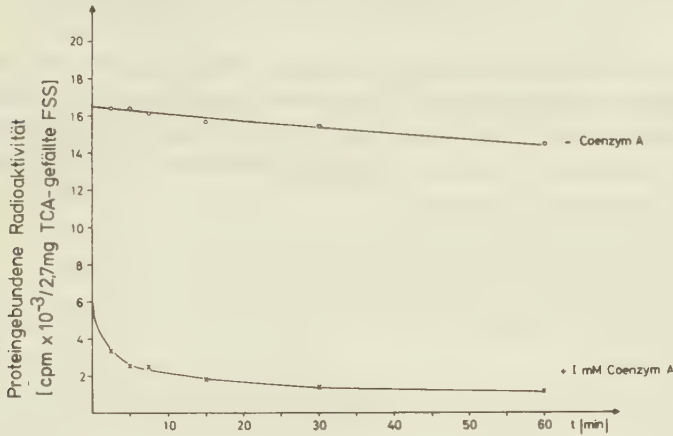


Abb. 3: Spezifische Rückübertragung von Malonylresten aus isolierter, DTNB-modifizierter Malonyl-FSS auf CoASH.

DTNB-Inkubation: 10^{-3} M, 2 h, 25° C, V = 3 ml, 0,1 M KPO_4 pH 6,5, 74 mg FSS.

$3\text{-}^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA-Inkubation: 10^{-4} M, 30 min, 0° C.

Gelfiltration an Sephadex G 50. Inkubation der isolierten ^{14}C -Malonyl-FSS mit (x-x) bzw. ohne (o-o) Coenzym A über 10-60 min und Bestimmung der dann noch proteingebundenen Radioaktivität nach 7.2.3.

Wie aus Abb. 3 ersichtlich, wird unter diesen Bedingungen der Malonylrest rasch und fast vollständig auf CoA-SH übertragen, extrem langsam dagegen auf H_2O . Dies zeigt die Stabilität des Malonylenzyms gegenüber hydrolytischer Spaltung und beweist die Spezifität der Beladungsreaktion auch unter extremen Bedingungen.

Das Ergebnis läßt es auch zu, sehr geringe Konzentrationen ($\leq 10^{-4}$ M) Malonyl-CoA in den präparativen Beladungsversuchen einzusetzen und die verlangsamte Beladung durch etwas längere Inkubationszeit auszugleichen.

2.5. Palmityl-CoA-Einfluß auf die Malonylbeladung

Im Hinblick auf die eingangs erwähnte Möglichkeit, FSS könne vielleicht ein doppelspezifisches aktives Zentrum für die Katalyse des Malonyl- und Palmityltransfers besitzen, wird der Einfluß von Palmityl-CoA auf die Reaktion DTNB-modifizierter FSS mit Malonyl-CoA studiert.

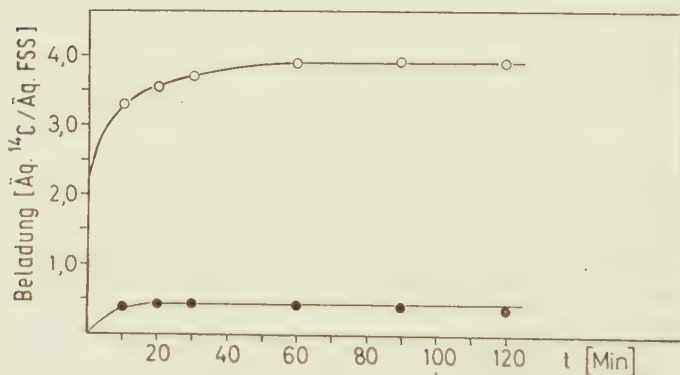


Abb. 4: Malonylbeladung der Malonyltransferase in Abwesenheit (o--o) und Gegenwart (●--●) von Palmityl-CoA.

Bedingungen: Je 3.6 mg FSS, 2 h, 10^{-3} M DTNB, 25°C , $V = 200\ \mu\text{l}$. Palmityl-CoA-Inkubation: Die Hälfte der Ansätze, 30 min., 10^{-4} M O°C . $3\text{-}^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA Inkubation: 10^{-4} M, 6470 cpm/nMol, 30 min., alle Ansätze, 0°C . Weitere Einzelheiten 7.2.2.1. und 7.2.2.2.

Wie aus Abb. 4 hervorgeht, wird die Aufnahme von Malonylresten durch dreißigminütige Vorinkubation des Multienzymkomplexes mit 10^{-4} M Palmityl-CoA fast völlig verhindert. Mehrere Deutungen sind möglich:

1. Die Akzeptorgruppe im aktiven Zentrum von Malonyl- und Palmityltransferase ist identisch.
2. Die Akzeptorgruppe für den Palmitylrest befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zur Akzeptorgruppe für den Malonylrest und verhindert durch sterische Abschirmung die Malonylbeladung.
3. Die Palmitylbeladung verhindert durch negative Kooperativität die Malonylbeladung.
4. Palmityl-CoA zerstört die Malonyltransferase durch Detergenseffekt, dies muß in Betracht gezogen werden, da die eingesetzte Palmityl-CoA-Konzentration über der von Zahler angegebenen, kritischen Micellenbildungskonzentration von 3-4 μM liegt (47).

Klärung zum Punkt 4 wird in diesem Kapitel erbracht werden. Eine Entscheidung über das Zutreffen einer der unter Punkt 1-3 gegebenen Möglichkeiten wird in späteren Kapiteln gefällt werden.

Eine zur Kontrolle durchgeführte Vorinkubation der DTNB-FSS mit 5×10^{-4} M Acetyl-CoA zeigt, daß durch dieses Substrat die Aufnahme von Malonylresten auf etwa 30 % verringert, jedoch nicht unterbunden wird (Abb. 5).

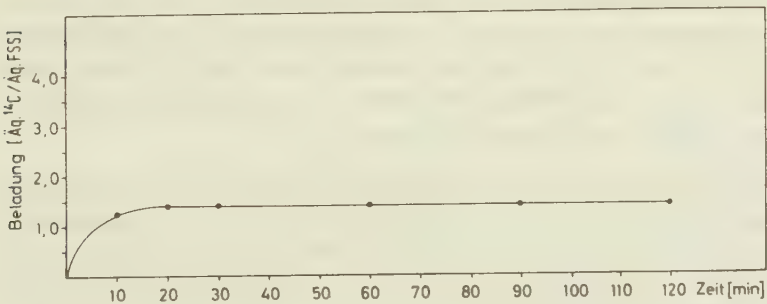


Abb. 5: Malonylbeladung der Malonyltransferase in Gegenwart von Acetyl-CoA

Bedingungen: Je 4.2 mg FSS, 2×10^{-4} M DTNB, 10^{-3} M DTNB, 25°C , $V = 200 \mu\text{l}$. Acetyl-CoA-Inkubation: 5×10^{-4} M, 20 min., 0°C ; dann $3\text{-}^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA-Inkubation: 10^{-4} M, 10-120 min., (17008 cpm/nMol) Einzelheiten s. 7.2.

Daraus folgt unmittelbar, daß es von Acetylbindungsstellen unabhängige Malonylbindungsstellen geben muß. Da bisherige (34, 41) und später beschriebene, peptidchemische Arbeiten keinerlei Hinweise auf gemeinsame Transferasen für Malonyl- und Acetylreste ergeben haben, wird die Verringerung der Malonylbeladung nach Acetylbeladung vorläufig durch konformative Effekte gedeutet. Vom funktionellen Standpunkt ist dieser Effekt günstig, da der Acetylrest leichter über die zentrale SH-Gruppe die Startposition auf der peripheren SH-Gruppe erreicht, wenn eine Malonylaufnahme momentan erschwert ist.

2.6. Beladungszahl der Palmityltransferase (Testprinzip 1)

Die Reaktion von FSS mit Palmityl-CoA wird insbesondere von Ayling und Schreckenbach beschrieben. Zur Markierung von Palmitylbindungsstellen inkubieren diese Autoren native FSS mit Palmityl-CoA und trennen für weitere Arbeiten überschüssiges Palmityl-CoA durch bis zu 30-faches (41) bzw. 10-faches (15) Waschen des denaturierten Enzyms mit einem Butanol-Äthanol-HCl-Gemisch ab.

Schreckenbach gibt die spezifische Beladung reaktiver Thiol- und Nichtthiolgruppen zu 5-6 nMol Palmitinsäure pro nMol FSS an. Angesichts der geringen, eingesetzten Palmityl-CoA-Menge von 2×10^{-4} M dürfte dies kein Maximalwert sein. Es wird jetzt versucht, eine vollständige Beladung von Nichtthiolgruppen zu erzielen und diese zu quantifizieren.

Weber (48) sowie Lenard (49) haben die quantitative Abtrennung von Natriumdodecylsulfat (SDS) von Proteinen durch Ionenaustauschchromatographie in Gegenwart von Harnstoff erzielt. In Analogie dazu wird wie früher mit DTNB modifizierte FSS mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Palmityl-CoA inkubiert, durch Eingießen in Harnstoff (Endkonzentration 6 M) denaturiert und durch Chromatographie an Dowex 2×10 von nicht kovalent gebundenem Palmityl-CoA befreit. In einem Kontrollexperiment wird DTNB-modifizierte FSS erst nach Denaturierung mit Palmityl-CoA versetzt und chromatographiert.

Wie Abb. 6, 7 zeigen, wird eine Beladung von etwa 4-5 Nicht-thiolgruppen erzielt.

Die Höhe des Wertes weist darauf hin, daß Palmityl-CoA spezifisch und unbeschadet einer Detergenzwirkung kovalent gebunden wird.

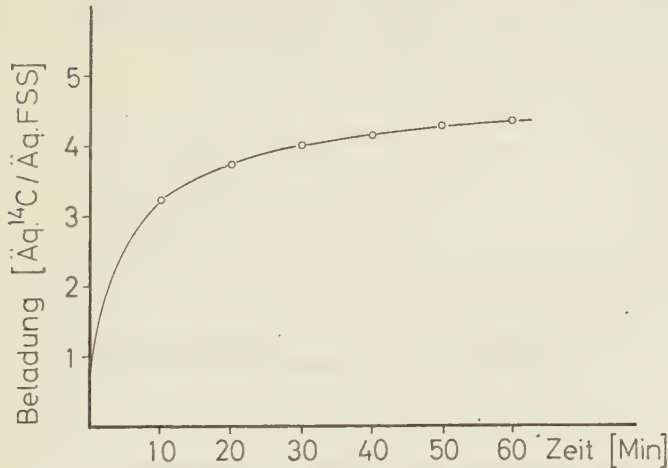


Abb. 6: Palmitylbeladung der Palmityltransferase
- Zeitabhängigkeit

Bedingungen: Je 4 mg FSS, 2 h, 10^{-3} M DTNB, 25°C , $V = 200\ \mu\text{l}$.
 $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Palmityl-CoA-Inkubation: 10^{-4} M (6400 cpm/nMol),
15-45 min., 0°C .

Weitere Einzelheiten: 7.2.2.3. und 7.2.2.5.

Wie oben beschrieben, nimmt FSS 4 Malonylreste nach DTNB-Inkubation auf. Palmityl-CoA verhindert das. Offenbar ist die Aufnahme von 4-5 Palmitylresten dafür verantwortlich und nicht eine Denaturierung des Enzyms. Falls diese Annahme richtig ist, so sollte man möglicherweise auch umgekehrt erwarten, daß die Palmityltransferasereaktion von Malonyl-CoA inhibitorisch beeinflußt wird. Eine solche Wirkung wird sicher beobachtet, falls Annahme 1 (s. 2.5.) richtig ist; sie wird vermutlich auch beobachtet, falls Annahme 2 zutrifft; sie wird jedoch nicht notwen-

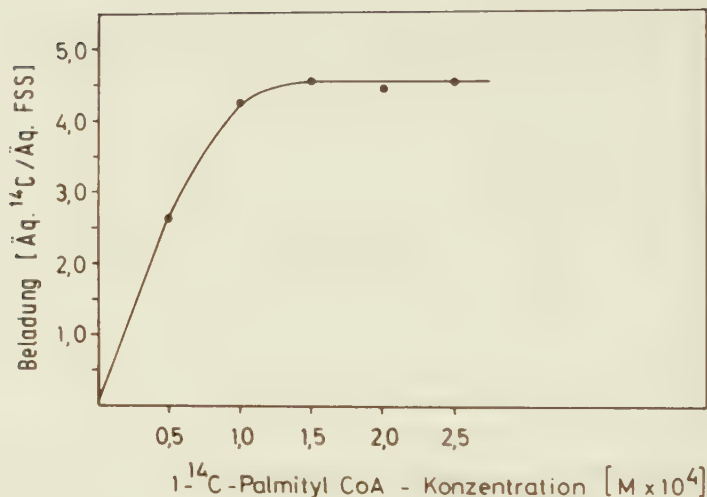


Abb. 7: Palmitylbeladung der Palmityltransferase
- Konzentrationsabhängigkeit

Bedingungen: Je 4 mg FSS, 2 h, 10^{-3} M DTNB, 25°C , $V = 200\ \mu\text{l}$.
 $1\text{-}^{14}\text{C}\text{-Palmityl-CoA-Inkubation}$; $0.5\text{-}2.5 \times 10^{-4}$ M (19100 cpm/nMol)
 30 min., 0°C .
 Weitere Einzelheiten s. 7.2.2.3. und 7.2.2.5.

digerweise beobachtet, falls Annahme 3 zutrifft. Das im nächsten Abschnitt beschriebene Experiment erhellt damit weitere Zusammenhänge zwischen den Transferasen.

2.7. Hemmung der Palmityltransferase

Der Palmityltransferasetest wird in Anlehnung an Arbeiten von Schweizer in der Variante von Ziegenhorn (34) ausgeführt (Gleichung 4).



Meßgröße ist die in der Testzeit (5 min. bei 25° C) gebildete Menge Palmityl-³H-CoA. Bei konstanter Palmityl-CoA-Konzentration wird die FSS-Konzentration variiert; damit können variable Detergenseffekte (etwa bei Substratvariation und konstanter FSS-Menge) mit Sicherheit ausgeschaltet werden. Nach Angaben von Ziegenhorn wird die Reaktion durch NEM nicht gehemmt, d.h. SH-Gruppen sind an der Katalyse nicht beteiligt (34).

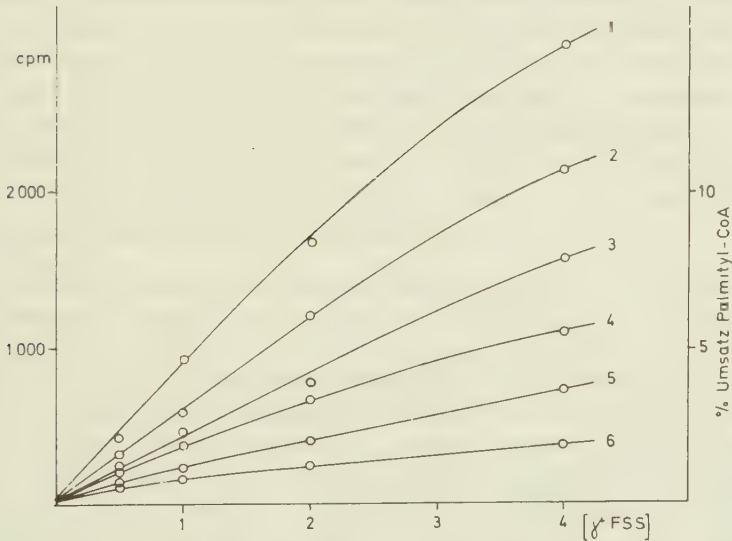


Abb. 8: Die Palmityltransferase-Teilreaktion in Gegenwart steigender Mengen Malonyl-CoA

1 = ohne Malonyl-CoA, 2-6 = steigende Mengen Malonyl-CoA
2 = 10 μ M, 3 = 20 μ M, 4 = 30 μ M, 5 = 50 μ M, 6 = 90 μ M.
20 μ M Palmityl-CoA, 30 μ M ³H-CoASH (2745 dpm/nMol, entsprechend 1008 cpm/nMol, FSS-Gesamtaktivität 1870 mE/mg V= 1 ml, t = 5 min.
Ausführung s. 7.2.4.

Wie Abb. 8 zeigt, wird die Palmityltransferase durch steigende Konzentrationen Malonyl-CoA stark gehemmt. Die gefundenen Restaktivitäten bei 10-90 μM Malonyl-CoA sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tab. 3: Einfluß steigender Mengen Malonyl-CoA auf die Palmityltransferaseaktivität
FSS-Aktivität 1870 mE/mg (Ausführung s. exp. Teil)

Malonyl-CoA (μM)	Palmityltransferase- aktivität (mE/mg)	Restaktivität (%)
0	178	100
10	120	67
20	92	52
30	72	40
50	48	27
90	33	19

Bei Verwendung gleicher Konzentrationen an Malonyl- und Palmityl-CoA wird etwa fünfzigprozentige Hemmung beobachtet. Dieser Wert erscheint physiologisch interessant, muß aber als In-vitro-Wert mit Vorsicht betrachtet werden. Das gewählte Testsystem enthält Serumalbumin, welches einen Teil des Palmityl-CoAs stark bindet und als Palmityl-CoA-Speicher betrachtet werden kann. Die stationäre Konzentration an Palmityl-CoA ist damit sicher viel geringer und der relative Hemmeffekt von Malonyl-CoA auf die Reaktion schwächer. Mit der Bindung von Palmityl-CoA an Serumalbumin dürften auch Befunde von Schweizer interpretierbar sein (50): Bei Messung des Palmityl- oder Arachyltransfers unter Variation der Substratkonzentration in Gegenwart von Serumalbumin wird eine sigmoide Anlaufphase beobachtet. In der vorliegenden Arbeit wird daher auf Anwendung dieses Testprinzipes verzichtet, da eine Auswertung nach Michaelis und Menten nicht erwartet werden kann.

Eine mögliche Kritik des Testergebnisses kann vorweggenommen werden: Würden Malonylreste über eine diskrete Malonyltransferase sehr viel schneller auf $^3\text{H-CoA-SH}$ übertragen als Palmitylreste von Palmityl-CoA über die Palmityltransferase, so könnte dies zu einer Verdünnung der spezifischen Radioaktivität des eingesetzten $^3\text{H-CoA-SH}$ führen und sich in einer scheinbaren Hemmung der Palmityltransferase durch Malonyl-CoA äußern. Da die Hemmung jedoch bei extrem niederen Umsatzraten beobachtet wird, scheint diese Möglichkeit nicht realisiert zu sein.

Arbeiten von Ayling (41) zeigen, daß die Reaktion von FSS mit ^{14}C -Palmityl-CoA (100 μM) durch Acetyl-CoA (200 μM) gestört wird. Unter den von ihr angegebenen Bedingungen hemmt Acetyl-CoA die kovalente Bindung von Palmitylresten an die Nichtthiolgruppen des Komplexes zu 47 %. Die wahrscheinliche Beteiligung des kovalenten Intermediats Palmityl-O-FSS an der Palmityltransferasereaktion läßt auf Grund dieser Daten einen Einfluß von Acetyl-CoA auf diese Reaktion erwarten. Abb. 9 zeigt das Ergebnis entsprechender Versuche.

Bei niederen Acetyl-CoA-Konzentrationen (50 μM), vergleichbar den Malonyl-CoA-Konzentrationen von Abb. 8, wird keine Hemmung beobachtet. Bei hohen Acetyl-CoA-Konzentrationen wird dagegen eine partielle Hemmung deutlich meßbar, sie beträgt bei einer Acetyl-CoA-Konzentration von 250 μM , die der von Ayling eingesetzten Konzentration von 200 μM ähnlich ist, 31 % und bei 10^{-3}M Acetyl-CoA ca. 63 %, ist also sehr viel schwächer als die Hemmung durch Malonyl-CoA. Mehrere Erklärungsmöglichkeiten sind denkbar:

Da FSS eine starke Deacylasewirkung gegen Acetyl-CoA ausübt (s.u. und 43, 10), ist eine Verdünnung von $^3\text{H-CoA-SH}$ in Betracht zu ziehen, aber auf Grund des Ergebnisses von Ayling vermutlich nicht Hauptklärungsgrund. Eine Deutung durch Besetzung der Palmitylbindungsstellen durch Acetylreste wird durch den früher erwähnten Vergleich peptidchemischer Arbeiten von Ziegenhorn und Ayling bzw. Schreckenbach ausgeschlossen. Denkbar ist, daß Palmityl-CoA vor der Transferreaktion über Teile des Coenzym-A-Restes an FSS binden muß und daß der Coenzym-A-Teil des Acetyl-

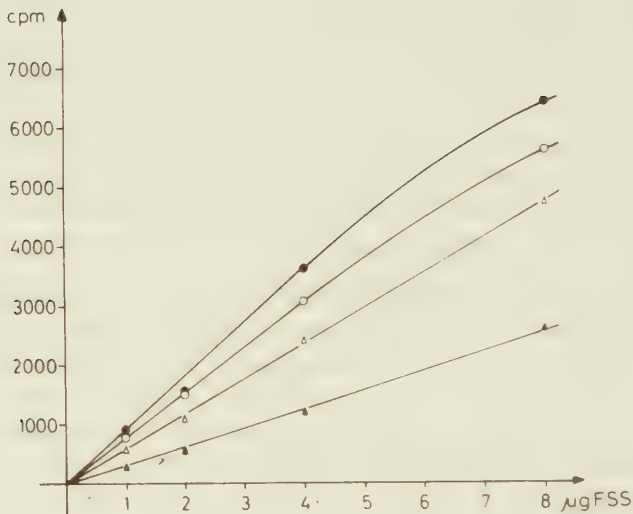


Abb. 9 : Die Palmityltransferase-Teilreaktion in Gegenwart steigender Mengen Acetyl-CoA.

●—● = ohne Acetyl-CoA; ○—○ = 50 μM , Δ — Δ = 250 μM ,
▲—▲ = 1 mM Acetyl-CoA; 30 μM Palmityl-CoA, 30 μM ^3H -CoASH,
FSS-Aktivität 1840 mE/mg, V = 1 ml, t = 5 min.
Ausführung s. 7.2.4.

CoA diese 'Erkennung' stört. Alternativ sind Konformationsänderungen durch kovalente Bindung von Acetylresten z.B. an die Acetyltransferase als Inhibitionsursache denkbar. Interessanterweise ist die Hemmung der Palmityltransferase durch hohe Konzentrationen Acetyl-CoA vergleichbar groß wie die Hemmung der Beladung von DTNB-FSS mit Malonylresten nach Vorinkubation mit Acetyl-CoA in Gegenwart von DTNB (vgl. 2.5.). Dies könnte angesichts der bisher beschriebenen funktionellen Zusammenhänge zwischen Palmityl- und Malonyltransferase darauf hindeuten, daß der Mechanismus der Hemmung in beiden Fällen ähnlich ist.

2.8. Reaktion mit Acetyl-, Malonyl- und Palmityl-CoA (Testprinzip 2)

Das Ziel der in diesem Abschnitt aufgeführten Messungen ist eine Überprüfung der bisher geschilderten Ergebnisse über funktionelle Zusammenhänge im Bereich der Transferasen von FSS.

Beruhend auf Testprinzip 2 (vgl. 2.1.) ist die Reaktion von DTNB-modifizierter FSS mit Malonyl-CoA und Acetyl-CoA früher von Sumper beschrieben worden (10). Diese Arbeiten werden zunächst überprüft; die experimentelle Durchführung orientiert sich im wesentlichen an Angaben von Sumper und ist im experimentellen Teil beschrieben, Proteinkonzentrationen sind jedoch höher, um zu genaueren Daten zu kommen.

Tab. 4 zeigt die Beladungszahlen, wenn als erstes Substrat Malonyl-CoA und als zweites Substrat Acetyl-CoA verwendet wird. Einer Beladung von 4.7 folgt eine Beladung von 4.3. Die Werte stimmen mit den Angaben von Sumper (5.5 gefolgt von 4.0) überein.

Die Freigabe von 4.7 Thiolgruppen bei Malonyl-CoA-Zugabe ist konsistent mit der Messung proteingebundener ^{14}C -Malonylreste (vgl. 2.3.), wenn man die vielfältigen Fehlerquellen bedenkt, die in unterschiedlichem Ausmaß in die beiden Testprinzipien eingehen:

1. Verwendung von FSS aus verschiedenen Anreicherungen
2. Bestimmung der spezifischen Radioaktivität von ^{14}C -Malonyl-CoA (im radioaktiven Test)
3. Potentielle Abspaltung von ^{14}C -Malonsäure im Moment der Denaturierung
4. Hohe Grundextinktion (im optischen Test) ($E_0 = 1.5$).
5. Unsicherheit über den exakten Wert des Extinktionskoeffizienten des 3-Carboxy-4-nitro-thiophenolats (44,51).

Die Umkehr der Substratzugabe ergibt für die Acetylbeladung einen Wert von 5.0 und für die nachfolgende Malonyl-Beladung einen Wert von 3.6 (Tab. 5).

TAB.4 BELADUNG DTNB- VORINKUBIERTER Fss MIT MALONYL- CoA ALS 1. SUBSTRAT UND ACETYL- CoA ALS 2. SUBSTRAT; TESTPRINZIP 2. s.2.1.1. INKUBATION MIT DTNB: 10^{-3} M, 2 H, 25°C, TEST IM VIERKÜVETTENSYSTEM NACH (10), $\lambda = 405$ NM, AUSFÜHRUNG S. 7.2.5.

VERSUCH	Fss- AKTIVITÄT VOR VORINKUBATION [ME/MG]	1. SUBSTRAT MalCoA (μ M)	BELADUNG	2. SUBSTRAT AcCoA (μ M)	BELADUNG	Fss-KONZENTR. [MG/ML]
1	1220	30 (1)	4,9	NICHT EIN- GESETZT	ENTFÄLLT	7,5
2	1220	60	4,5	"	"	7,5
3	1220	120 (1)	4,9	"	"	7,5
4	1710	55	5,0	60	4,8	4,9
5	1930	20	4,3	60	3,9	7,9
6	1930	40	4,5	60	3,8	6,3
7	2020	35	4,6	45	4,5	4,5
MITTEL					4,7	4,3

(1) = 0,2 M KPO_4 , PH 7,8, DREISTÜNDIGE VORINKUBATION

TAB.5 BELADUNG DTNB- VORINKUBIERTER FSS MIT ACETYL- CoA ALS 1. SUBSTRAT UND MALONYL- CoA ALS 2. SUBSTRAT; TESTPRINZIP 2. s.2.1.1. INKUBATION MIT DTNB: 10^{-3} M, 2 H, 25°C. TEST IM VIERKÜVETTENSYSTEM NACH (10), $\lambda = 405$ NM, AUSFÜHRUNG s.7.2.5.

VERSUCH	FSS- AKTIVITÄT VOR VORINKUBATION [ME/MG]	1. SUBSTRAT AcCoA (μ M)	BELADUNG	2. SUBSTRAT MalCoA (μ M)	BELADUNG	FSS-KONZENTR. [MG/ML]
1	1710	60	4,9	55	4,9	4,9
2	1710	60	5,3	55	3,7	4,9
3	1710	60	5,4	55	3,3	4,9
4	1930	60	4,6	20	2,8	7,9
5	1930	60	4,9	20	2,5	6,3
6	2020	44	4,7	35	3,5	4,5
7	2020	44	5,0	35	4,5	4,5
MITTEL					5,0	3,6

Beide Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Zahlen von Sumper, der für die Acetylbeladung einen Wert von 7.8 und für die nachfolgende Malonyl-Beladung den Wert 0 angibt. Die Ursache für die unterschiedlichen Acetylwerte ist unklar. Der eigene Wert stimmt jedoch wesentlich besser mit dem von Ziegenhorn (52) im radioaktiven Test mit ^{14}C -Acetyl-CoA gefundenen Wert (3 gefolgt von 1.3 = 4.3) überein und erscheint angesichts der höheren verwendeten Proteinmengen genauer als frühere Daten. Eine bisher zur Erklärung der Diskrepanz zwischen den Werten von Ziegenhorn und Sumper geäußerte Hilfsvorstellung, im Verlauf der Reaktion von FSS mit Acetyl-CoA würden Thiolgruppen des Enzyms freigesetzt, erscheint nicht mehr notwendig (10,24).

Die in Abschnitt 2 durchgeführten Messungen proteingebundener ^{14}C -Malonsäure nach Acetyl-CoA-Vorinkubation bestätigen die vorliegenden, optischen Daten: Nach beiden Testprinzipien wird nach einer Acetylbeladung noch eine Malonylbeladung gefunden, jedoch beträgt die Malonylbeladung nur ca. 30-60 % des Wertes, der bei Abwesenheit von Acetyl-CoA beobachtet wird. Eine Erklärung für den Wert 0 von Sumper dürfte in einer Verdeckung der Malonyl-Aufnahme durch eine Deacylasereaktion von Acetylenzym zu suchen sein. Diese Deacylase äußert sich - nach einem primären Extinktionssprung, welcher auf die Absättigung der Acylbindungsstellen zurückgeht - in einer kontinuierlichen Extinktionszunahme der Lösung und könnte die bei Verwendung niedriger Proteinkonzentrationen niederen Extinktionssprünge nach Zumischen von Malonyl-CoA verdecken.

Der kontinuierliche Extinktionsanstieg nach Acetyl-CoA-Zugabe wird oben ohne weitere Angaben als durch Deacylasewirkung hervorgerufen, bezeichnet. Dies ist tatsächlich berechtigt: Im selben Ausmaß wie Acetyl-CoA aufgebraucht wird (nämlich durch Beladung der FSS mit Acetylresten gefolgt von einer Zersetzung des Acetylenzyms zu Essigsäure unter Rückbildung von FSS), erreicht die Reaktion ein Plateau ($\Delta E/\text{Min} = 0$). Wird zu diesem Zeitpunkt die ursprüngliche Menge Acetyl-CoA erneut zugegeben, so kommt es wieder zum Extinktionssprung (entsprechend einer primären Absättigung der Acetyltransferase) gefolgt von der kontinuierlichen Extinktionszunahme, usw.

Der Test wird nun durch Hinzunahme von Palmityl-CoA erweitert, um die bisher gefundenen Zusammenhänge zwischen Malonyl- und Palmityltransferase zu prüfen. Das Ergebnis zweier entsprechenden Versuche ist in Abbildungen 10 und 11 dargestellt.

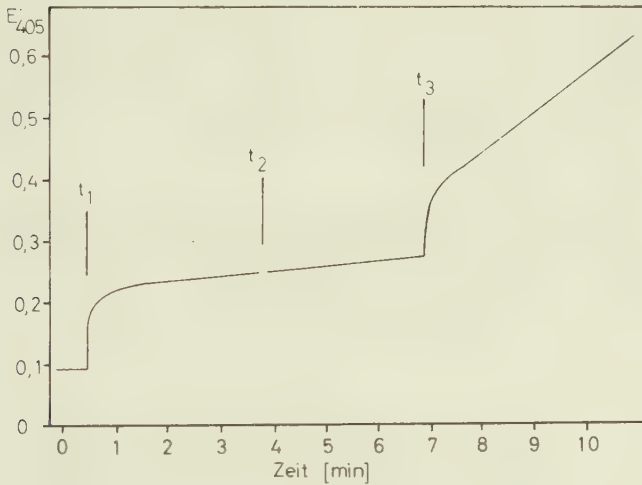


Abb. 10: Inkubation DTNB-vorinkubierter FSS mit Palmityl-CoA (27 μM) als 1. Substrat zum Zeitpunkt t_1 , mit Malonyl-CoA (35 μM) als 2. Substrat zum Zeitpunkt t_2 und mit Acetyl-CoA (25 μM) als 3. Substrat zum Zeitpunkt t_3 , Enzymkonzentration 1.9 μM .

Erläuterungen s. Text und Exp. Teil 7.2.5.

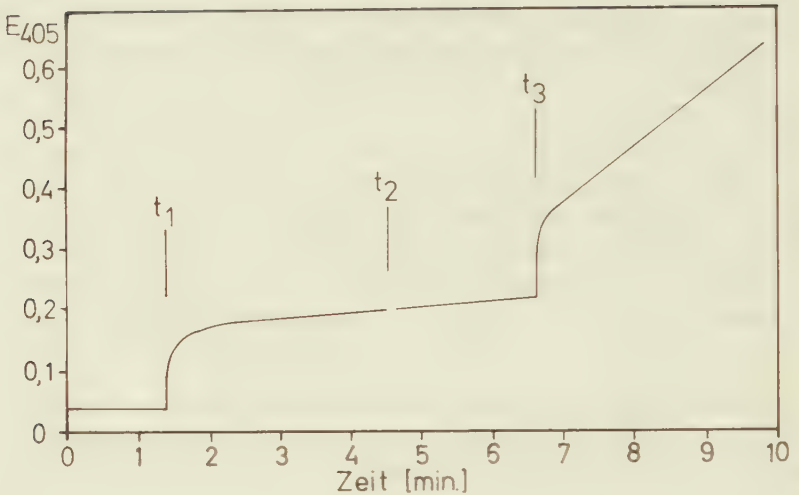


Abb. 11: Inkubation DTNB-vorinkubierter FSS mit Malonyl-CoA ($35 \mu\text{M}$) als 1. Substrat zum Zeitpunkt t_1 , mit Palmitoyl-CoA ($27 \mu\text{M}$) als 2. Substrat zum Zeitpunkt t_2 und mit Acetyl-CoA ($25 \mu\text{M}$) als 3. Substrat zum Zeitpunkt t_3 . Enzymkonzentration $1.9 \mu\text{M}$.
Erläuterungen s. Text und Exp. Teil 7.2.5.

Danach reagiert DTNB-modifizierte FSS mit Palmitoyl-CoA, danach nicht mehr mit Malonyl-CoA, jedoch noch mit Acetyl-CoA. DTNB-modifizierte FSS reagiert mit Malonyl-CoA, danach nicht mehr mit Palmitoyl-CoA, jedoch noch mit Acetyl-CoA. Die Beladung mit Palmitoylresten bei Zugabe von Palmitoyl-CoA als 1. Substrat ist gleich hoch wie die alternative Beladung durch Malonylreste bei Zugabe von Malonyl-CoA als 1. Substrat.

Im Abschnitt 2.4. ist die relativ große Stabilität von isoliertem ^{14}C -Malonylenzym gegen Hydrolyse anhand der Stabilität proteingebundener Radioaktivität dargelegt worden. Dementsprechend folgt in Abb. 11 dem primären Extinktionssprung nach Malonyl-CoA-Zugabe nur eine extrem langsame Extinktionszunahme. Wie der Vergleich dieses Experiments mit dem Experiment der Abb. 10 zeigt, ist das Palmitylenzym vergleichbar stabil gegen hydrolytische Zersetzung. Dies ist im Einklang mit Resultaten aus Experimenten von Ayling, in denen nach Inkubation nativer FSS mit ^{14}C -Palmityl-CoA keine Bildung von ^{14}C -Palmitinsäure gefunden wurde. Bezüglich dieser Nebenreaktion des aktiven Zentrums sind also Palmityl- und Malonyltransferase vergleichbar, jedoch wie oben gezeigt, ganz verschieden von der Acetyltransferase.

In weiteren (Kontroll-)Experimenten wird Acetyl-CoA als 1. Substrat eingesetzt, gefolgt von Palmityl-CoA als 2. und Malonyl-CoA als 3. Substrat. Dem Extinktionssprung nach Acetyl-CoA-Zugabe folgt ein kleinerer Extinktionssprung bei Palmityl-CoA-Zugabe, jedoch keine sprunghafte Extinktionszunahme bei Malonyl-CoA-Zugabe.

Wird nach Zumischen von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA zu DTNB-modifizierter FSS Palmityl-CoA als 3. Substrat zugegeben, so läßt sich nach den zwei primären Extinktionssprüngen keine weitere sprunghafte Extinktionszunahme feststellen.

2.9. Diskussion

Die Experimente dieses Abschnitts sind durchgeführt worden, um funktionelle Zusammenhänge der Acetyl-, Malonyl- und Palmityltransferase zu erhellen. Der Vergleich der Beladungshöhe DTNB-modifizierten Enzyms zeigt, daß für Acetyl-, Malonyl- und Palmitylreste je etwa gleich viele, nicht thiolartige Bindungsstellen existieren.

Die spezifischen Markierungsstudien und Kompetitionsversuche haben Hinweise ergeben, daß eine sehr enge Beziehung zwischen Malonyl- und Palmityltransferase besteht, die durch Identität, enge räumliche Nachbarschaft oder enge, negativ-kooperative Kopplung gedeutet werden kann. Das ähnliche, schwache Deacylaseverhalten von FSS gegen Malonyl-CoA und Palmityl-CoA, sicherlich eine Nebenreaktion am aktiven Zentrum, deutet auf die Verwirklichung der ersten Erklärungsmöglichkeit hin. Daneben haben obige Messungen ergeben, daß Malonyl- und Palmityltransferase nicht ganz unabhängig sind von einer vorherigen Inkubation des Enzyms mit Acetyl-CoA. Dies wird durch konformative Effekte gedeutet und nicht durch die direkte Besetzung von Malonyl- oder Palmityl-Bindungsstellen durch Acetylreste.

3. Peptidchemische Charakterisierung der Malonyltransferase

3.1. Isolation von ^{14}C -Malonylpeptiden

3.1.1. Markierung der Akzeptor-Gruppe - Wahl der Protease

In den Arbeiten von Schweizer zur Charakterisierung von Malonyl-Bindungsstellen der FSS wird ^{14}C -Malonyl-FSS oder ^{14}C -Methylmalonyl-FSS mit der Protease Pepsin gespalten (29). Die dabei anfallende große Zahl von Spaltstücken wird zahlreichen Fraktionierungsverfahren unterworfen, die nur im Falle der perameisensäurestabilen Fraktionen zu reinen Peptiden führen. Da beim vorliegenden Problem die Bindung von Malonylresten an SH-Gruppen des Enzyms unerwünscht ist und die Isolation größerer Mengen Peptidmaterials aus der Malonyltransferase angestrebt wird, wird DTNB-modifizierte FSS verwendet und die Beladung in Gegenwart von überschüssigem DTNB durchgeführt, um das Gleichgewicht auf die Seite von Malonylenzym zu verschieben. Die Reaktionsbedingungen, unter denen mit DTNB modifiziert und mit Malonyl-CoA inkubiert wird, orientieren sich an den Versuchen von Kapi-

tel 2. Die im folgenden exemplarisch beschriebene Anreicherung geht von 1000 mg Protein aus.

Ziegenhorn (34) beschreibt Versuche, durch peptische Spaltung von DTNB-modifizierter ^{14}C -Acetyl-FSS zu sauberen Peptiden aus dem aktiven Zentrum der Acetyltransferase zu kommen. 16 verschiedene radioaktive Fraktionen fallen bei diesem Verfahren an; deren Trennung ist zeitraubend und deren Menge ist gering.

Im vorliegenden Fall wird die von Ziegenhorn später erfolgreicher eingesetzte Methode der Spaltung mit Trypsin verwendet. Zur weitgehenden Schonung alkalilabiler Bindungen wird in diesem Verfahren bei pH 7.0 gearbeitet und die bei diesem pH-Wert verminderte Reaktivität des Trypsins durch Verwendung größerer Mengen der Protease (15 Gew. %) und längerer Inkubationszeiten (15 Std.) ausgeglichen. Vorversuche zeigen, daß aus mit Trichloressigsäure (TCA) denaturiertem Malonylenzym ca. 40 % radioaktives Material freigesetzt wird. Das Verfahren hat neben Vorzügen mehrere Nachteile.

1. Die TCA-Denaturierung beendet zwar augenblicklich die Beladungsreaktion, die Waschung denaturierten Proteins mit TCA entfernt auch wirksam überschüssige Reagenzien, schafft jedoch einen relativ klumpigen Niederschlag. Da die Spaltung dieses Niederschlags in heterogener Phase durchgeführt werden muß, muß ein heterogenes Spaltmuster erwartet werden.
2. Ein Teil der Cysteinreste liegt nach der Vorinkubation mit DTNB als Disulfid vor. Die Disulfid-Bindung ist jedoch wie die freien SH-Gruppen der restlichen Cysteine gegen Redox-Vorgänge empfindlich.

3.1.2. Denaturierungsbedingungen - Carboxymethylierung

Es werden etliche Verfahren erprobt, in die tryptische Spaltung ein stabil derivatisiertes, nach Denaturierung lösliches Proteinpräparat einzusetzen. Von der TCA-Fällung wird abgegangen, da derart denaturiertes Protein weder mit Harnstoff, noch mit

Guanidinhydrochlorid noch mit Natriumdodecylsulfat (SDS) in Lösung zu bringen ist.

Stattdessen wird durch Eingießen des Inkubationsansatzes in eine 9 M Harnstofflösung (Endkonzentration 6 M) denaturiert. Die frei werdenden SH-Gruppen reagieren zunächst mit dem anwesenden DTNB unter Farbvertiefung ab, werden dann mit einem Überschuß an 2-Mercaptoäthanol reduktiv freigesetzt und durch Behandlung mit Jodessigsäure in stabile, ionische Carboxymethylderivate (CM-FSS) überführt. Das Prinzip, das denaturierte Protein bis zur Einführung einer großen Zahl ionischer Gruppen durch chaotrope Agenzien wie Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid in Lösung zu halten, wird später auch zur Gewinnung citraconylierter CM-FSS erfolgreich verwendet (s. Kapitel 5).

Unter den im Carboxymethylierungsansatz befindlichen Reagenzien stören Jodid, Harnstoff und überschüssiges 3-¹⁴C-Malonyl-CoA weitere Schritte. Jodid bildet bei Zutritt von Licht freies Jod, welches Tyrosin, Tryptophan und Histidin modifiziert (53). Hohe Konzentration von Harnstoff stören die proteolytische Spaltung. Beide Reagenzien könnten durch Dialyse abgetrennt werden. 3-¹⁴C-Malonyl-CoA würde in den Peptidanreicherungsschritten ein radioaktives Peptid simulieren, da zunächst nach Radioaktivität angereichert wird. Ein Vorversuch zeigt, daß diese Verbindung durch 4 x 4-stündige Dialyse gegen

1. 50 Volumina 0.1 M Tris-HCl pH 6.8, 6 M Harnstoff
2. 3 x 60 Volumina Wasser

bei weitem nicht vollständig entfernt wird.

Das carboxymethylierte ¹⁴C-Malonyl-Protein wird daher im Dunkeln an Sephadex G 50 in Gegenwart von 6 M Harnstoff gelfiltriert und danach ausgiebig dialysiert.

3.1.3. Tryptische Spaltung

Die leicht opake Lösung (keine Suspension!) wird mit Tris-HCl-Puffer ad 0.1 M, pH 7.0 bei 37° C versetzt und 15 Stdn. mit 15 Gew.-% Trypsin (bezogen auf die ursprünglich in die

Malonyl-Beladung eingesetzte Menge FSS) verdaut. Die Reaktion wird durch Ansäuern und Zentrifugation beendet. Der lösliche und der unlösliche Teil des Spaltansatzes wird getrennt aufgearbeitet, letzterer wird zunächst bei -15°C eingefroren gelagert.

3.1.4. Gel-Chromatographie

Der lösliche Teil des Spaltansatzes, der 70 % der ursprünglich proteingebundenen Radioaktivität enthält, wird durch Chromatographie an Sephadex G 25 in 6 M Harnstoff vorfraktioniert. Wie Abb. 12 zeigt, tritt im Elutionsprofil des Sephadexlaufs zwischen Ausschluß- und Gesamtvolumen ein radioaktiver Gipfel mit Schulter auf (I, II), während offenbar eine große Menge nicht radioaktiver Spaltstücke abgetrennt wird.

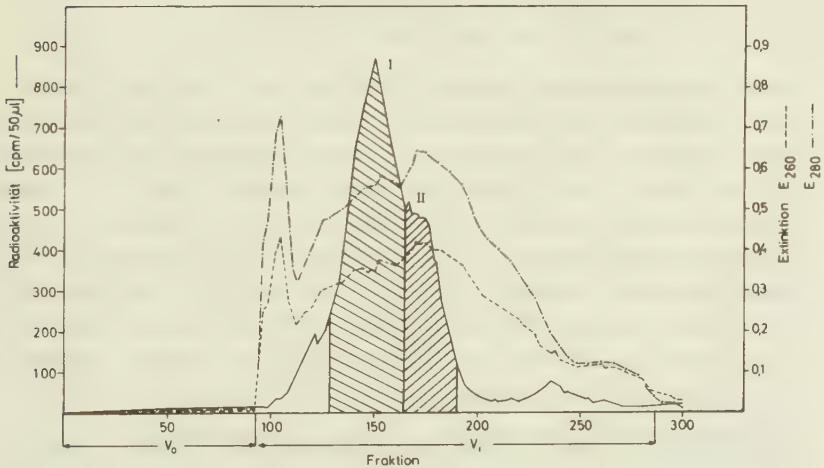


Abb. 12: Sephadex G25-Chromatographie des tryptischen Spaltgemisches von ^{14}C -Malonyl-CM-FSS.

Säule 5 x 110 cm, Puffer: 0.1 M Tris-Acetat, pH 4.5, 6 M Harnstoff; Durchfluß 170 ml/h; Probenvolumen 12 ml, Fraktionsvolumen ca. 7 ml.

3.1.5. Ionenaustausch-Chromatographie

In Vorversuchen zeigt es sich, daß die durch Gelchromatographie gewonnenen Spaltstücke an den starken Kationenaustauscher SP-Sephadex selbst bei pH 3,4 nicht binden. Die gebundene Malonyl-Gruppe verleiht den Peptiden offenbar relativ sauren Charakter. Daher werden die Fraktionen des Gipfels I und II durch Chromatographie an DEAE-Cellulose weiter gereinigt (Die starke Bindung an den Austauscher unter Startbedingungen macht eine Entfernung von Harnstoff oder eine Verringerung des Volumens vor dem Aufsetzen unnötig).

Das Elutionsprofil von Peptid I ist auf Abb. 13 dargestellt; das Elutionsprofil von Peptid II auf Abb. 14. Geringe Mengen radioaktiver Begleitstoffe (Randfraktionen) werden verworfen, die Wiederfinderate beträgt 74 %.

3.1.6. Hochspannungspapierelektrophorese

- Aminosäurezusammensetzung

Zur Hochspannungspapierelektrophorese wird ein nach dem Prinzip von Michl (53) arbeitendes Gerät verwendet, bei dem die Kühlung des Papiers durch ein organisches Lösungsmittel erfolgt, in dem Peptide im allgemeinen nicht löslich sind. Der Vorzug gegenüber etwa einer Flachbettelektrophorese-Apparatur nach Wieland und Pfeleiderer (55) besteht in den durch die Gerätedimensionierung bedingten längeren Laufstrecken. Ein Nachteil ist, daß lokale Feldstärkeschwankungen durch nicht gleichmäßige Befuchtung des Papiers mit Puffer auftreten können. Dieser Nachteil wiegt bei Verwendung von Markerfarbstoffen (56) gering.

Die Peptide werden in den späteren Anreicherungen ausschließlich anhand ihrer Radioaktivität durch Autoradiographie lokalisiert, da sich in Vorversuchen herausstellt, daß sie weder mit Ninhydrin, noch mit Fluram, noch mit dem von Roth (57) beschriebenen o-Phtalaldehyd-Reagenz angefärbt werden können (In Übereinstimmung mit Benson und Hare (58) finden wir, daß zumindest im Fall der als Marker eingesetzten Aminosäuren o-Phtalaldehyd das empfindlichste Nachweisreagenz ist). Hiermit ergibt sich der Verdacht einer N-terminalen Blockierung der ¹⁴C-Malonylpeptide.

Abb. 13

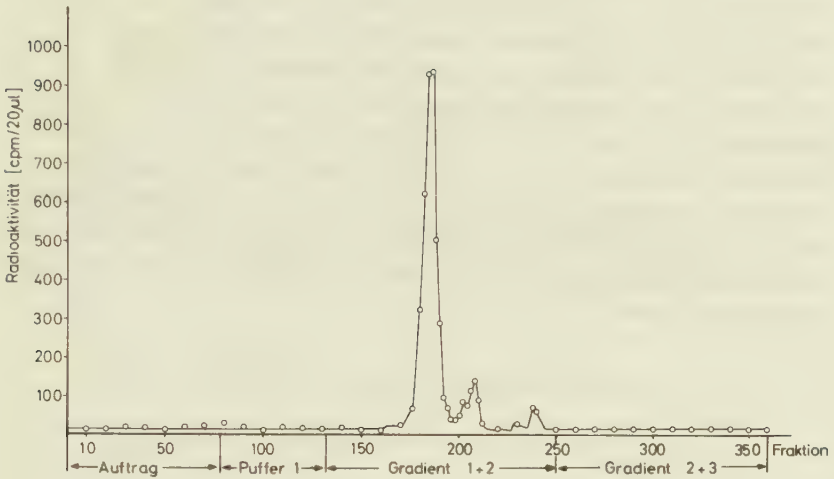


Abb. 14

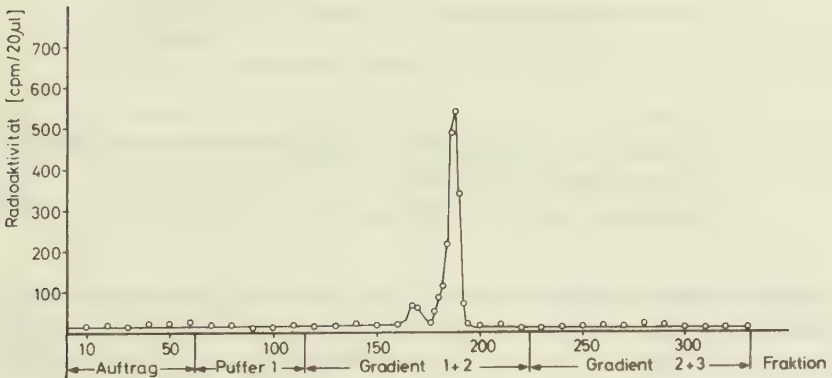


Abb. 13 und 14 Whatman DE-52-Chromatographie der ^{14}C -Malonylpeptide I und II

Säulen jeweils 2 x 18 cm, Puffer 1 = 0.05 M Pyridin-Acetat, pH 6.0; Puffer 2 = 0.5 M Pyridin-Acetat, pH 5.0, Puffer 3 = 2 M Pyridin-Acetat, pH 4.0, Fraktionsvolumen je ca. 7 ml. Probenvolumen: Abb. 13 (I) 560 ml; Abb. 14 (II): 450 ml

Hochspannungspapierelektrophorese von Peptid II erfolgt zunächst bei pH 6.5. Das Material spaltet in zwei radioaktive Banden auf IIa, IIb (Wanderungsverhalten vgl. Abb. 15). Das Material der schneller wandernden Bande IIa erweist sich anhand der ganzzahligen Aminosäurezusammensetzung als reines Pentapeptid (s. Tab. 6), in dem neben einem Äquivalent ^{14}C -Malonsäure Tyrosin, Leucin, Glycin, Serin, und Glutamin-(säure) je einmal vorkommen; Ausbeute 142 nMol. Die langsamere Bande IIb ist ein analysenreines Hexapeptid, das neben den oben für IIa angegebenen Aminosäuren zusätzlich Alanin enthält (s. Tab. 6); Ausbeute 6.0 nMol.

■=radioaktiv ○=fluram positiv o=Marker

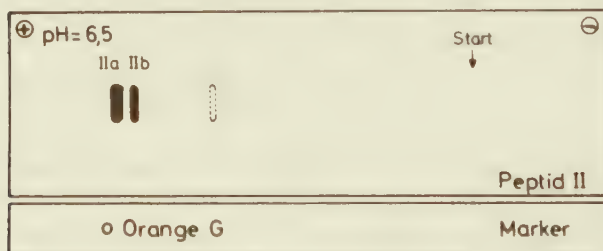


Abb. 15: Verhalten des Peptides II bei der Hochspannungspapier-elektrophorese, pH 6.5
Whatman 3 MM, 28 x 90 cm, 5000 V, 55 mA, $t \approx 2 \text{ h } 40 \text{ min}$

Das Peptidmaterial von Gipfel I ist nach der Hochspannungspapier-elektrophorese bei pH 6.5 (s. Abb. 16) noch verunreinigt. Es wird durch Hochspannungspapierelektrophorese bei pH 3.5 weiter gereinigt. Die Aminosäurezusammensetzung nach diesem Schritt (s. Tab. 6) und die Endgruppenanalyse (s. unten) zeigt, daß das Peptid danach frei von Verunreinigungen ist; Ausbeute 200 nMol.

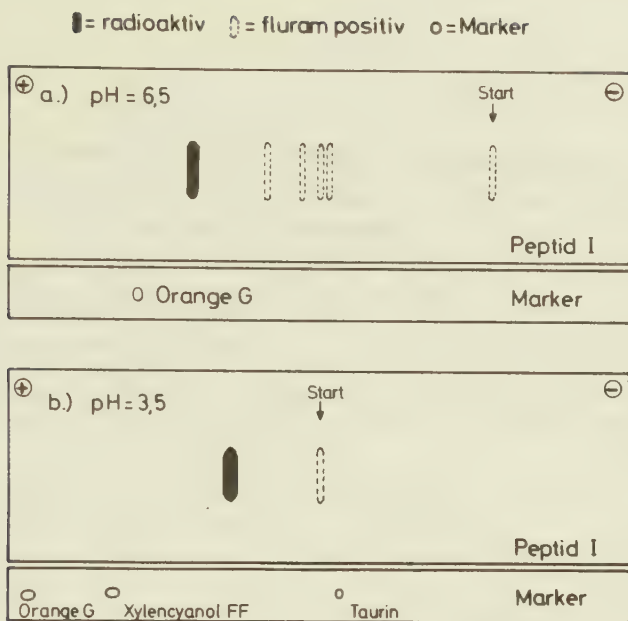


Abb. 16: Verhalten des Peptids I bei der Hochspannungspapierelektrophorese, pH 6,5 und 3.5.

Whatman 3 MM, 28 x 90 cm, 500 V, Laufzeiten 2 h 40 min. (pH 6.5) und 2 h 20 min (pH 3.5)

Der Anreicherungsang aller ^{14}C -Malonyl-Peptide ist schematisch auf Abb. 17 zusammengefaßt. Die Gesamtausbeute, bezogen auf die Beladung von FSS mit ^{14}C -Malonylresten, beträgt 29 %. Die Gesamtausbeute bezogen auf die nach der Spaltung löslichen, radioaktiven Peptide beträgt 35 %.

Da die Aminosäureanalyse der Peptide nach Perameisensäureoxidation und Hydrolyse zeigt, daß weder Taurin noch Cysteinsäure, die Oxidationsprodukte von Cysteamin und Cystein vorhanden sind,

TAB.6 AMINOSÄUREZUSAMMENSETZUNG DER 3- ¹⁴C- MALONYLPEPTIDE

AMINOSÄURE	AMINOSÄURERESTE / MOLEKÜL		
	PEPTID I	PEPTID II A	PEPTID II B
ASX, CM-CYS	0,1 (0)	-	-
THR	-	-	-
SER	1,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)
GLX	1,1 (1)	1,1 (1)	1,1 (1)
PRO	-	-	-
GLY	1,1 (1)	1,1 (1)	1,2 (1)
ALA	2,8 (3)	-	1,0 (1)
VAL	-	-	-
MET	-	-	-
ILE	-	-	-
LEU	2,0 (2)	0,9 (1)	0,9 (1)
TYR	1,0 (1)	0,9 (1)	0,9 (1)
D-ALA	-	-	-
PHE	-	-	-
LYS	-	-	-
HIS	-	-	-
ARG	-	-	-

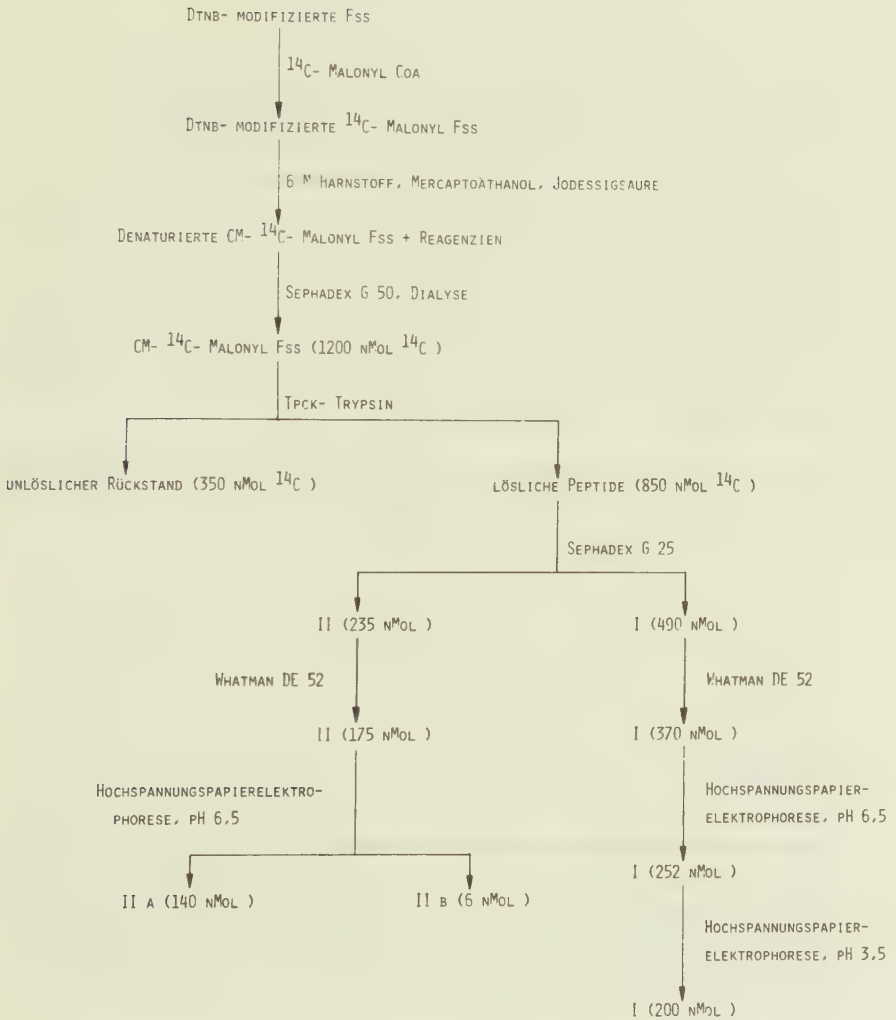


Abb. 17: Anreicherungsschema für 3-¹⁴C-Malonylpeptide

da außerdem die Ausbeute hoch ist, wird angenommen, daß sie aus dem aktiven Zentrum der Malonyltransferase stammen.

3.1.7. Aufarbeitung des tryptischen "Cores"

Der unlösliche Rückstand der tryptischen Spaltung enthält 30 % der gesamten, ursprünglich proteingebundenen Radioaktivität. Um sicher zu gehen, daß in diesem Rückstand keine Anreicherung von Peptiden stattgefunden hat, in denen Malonylreste an einen anderen Primärstrukturabschnitt gebunden sind als bei den löslichen Peptiden der tryptischen Spaltung, wird der Rückstand in Puffer suspendiert und erneut mit der ursprünglichen Menge Trypsin 10 Stdn. bei 37° C gespalten. Durch dieses Verfahren werden weitere 140 nMol gebundener Radioaktivität freigesetzt. Die Gesamtausbeute löslichen, radioaktiven Materials beträgt damit 990 nMol, entsprechend 82 %.

Die Vorreinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Sephadex G 25 (s. Abb. 18) im wesentlichen wird nur ein radioaktiver Gipfel beobachtet.

Bei der Ionenaustauschchromatographie an Whatman DE 52 wird eine geringe Menge radioaktiven Materials vom Hauptgipfel abgetrennt (s. Abb. 19). Der Hauptgipfel zeigt bei der abschließenden Hochspannungspapierelktrophorese bei pH 6.5 (Abb.20) gleiches Wanderungsverhalten wie Peptid IIa der ursprünglichen (Abb. 15) Spaltung. Die Aminosäurezusammensetzung (s. Tab. 7) ist dieselbe wie bei IIa, ebenso das Verhalten bei der Endgruppenanalyse (s. unten). Das Material wird daher mit IIa vereint, da die Peptide offenbar identisch sind. Dies bedeutet jedoch, daß in dem unlöslichen "Core" der tryptischen Spaltung keine Anreicherung von Peptiden stattfindet, die Malonylreste an einen anderen Teil der Primärstruktur gebunden enthalten als bei den löslichen Peptiden der Spaltung.

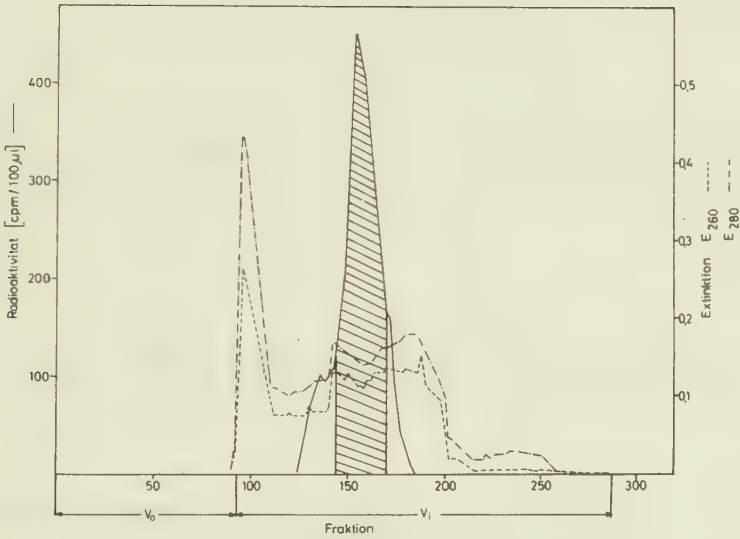


Abb. 18: Sephadex G 25-Chromatographie des 2. tryptischen Spaltgemischs von ^{14}C -Malonyl-CM-FSS.

Säule 5 x 110 cm; Puffer 0.1 M Tris-Acetat, pH 4.5, 6 M Harnstoff; Durchfluß 170 ml/h; Probenvolumen 12 ml, Fraktionsvolumen ca. 7 ml.

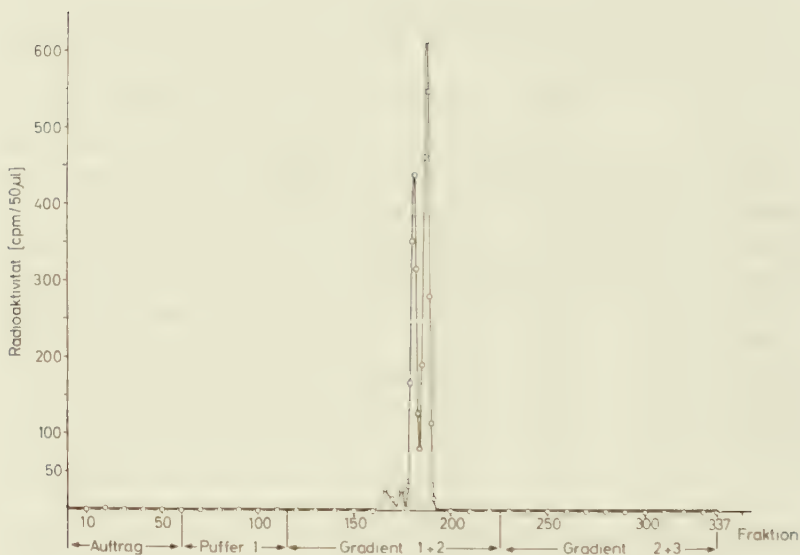


Abb. 19: Whatman DE 52-Chromatographie der ^{14}C -Gipfelfraktion von Abb. 18 (tryptische Nachspaltung)

Säule: 2 x 18 cm, Puffer: wie in Abb. 13 und 14, Fraktionsvolumen ca. 7 ml, Probenvolumen 444 ml

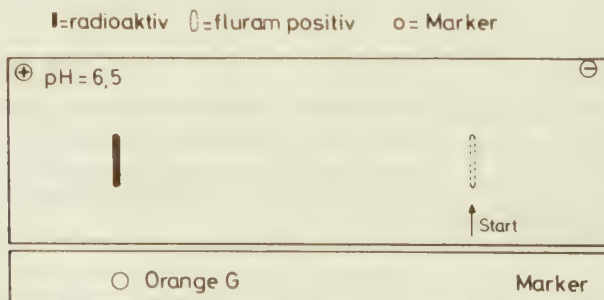


Abb. 20: Verhalten der radioaktiven Hauptkomponente der tryptischen Nachspaltung bei der Hochspannungspapierelektrophorese, pH 6.5.

Whatman 3 MM, 28 x 90 cm, Laufzeit 2 h 40 min.

TAB.7 AMINOSÄUREZUSAMMENSETZUNG DES AUS DER NACHSPALTUNG DES TRYPTISCHEN RÜCKSTANDES DURCH KOMBINATION MEHRERER ANREICHERUNGSVERFAHREN ISOLIERTEN ^{14}C -MALONYLPEPTIDS

AMINOSÄURE	ÄQUIVALENTE/ ÄQUIVALENT PEPTID
ASX, CM-CYS	-
THR	-
SER	0,9
GLX	1,1
PRO	-
GLY	1,1
ALA	-
VAL	-
MET	-
ILE	-
LEU	0,9
TYR	0,9
β -ALA	-
PHE	-
LYS	-
HIS	-
ARG	-

3.1.8. Diskussion

Vermutlich erleichtert durch den kovalent gebundenen Malonylrest und durch die Verwendung hoher Konzentrationen an Harnstoff zur Aggregatspaltung in der Gelchromatographie lassen sich ausgehend von trypsingespaltener Malonyl-FSS in nur drei Reinigungsschritten ein reines Penta- und ein Hexapeptid, sowie in vier Schritten ein Nonapeptid isolieren.

Demgegenüber ist für die Reindarstellung von ^{14}C -Acetylpeptiden die Anwendung von vier (für T_1, T_2, T_3, T_5) bzw. sechs (T_4, T_6) Reinigungsverfahren beschrieben (34), während für die Reindarstellung des ^{14}C -Carboxamidomethylpeptides T_B aus dem aktiven Zentrum des kondensierenden Enzyms 5 Trennoperationen angewandt werden müssen (59).

Die Gesamtausbeute radioaktiver Peptide ist in Tab. 8 noch einmal zusammengefaßt. Sie beträgt insgesamt 386 nMol, d.h. bezogen auf die ursprünglich erzielte Proteinbeladung 32 % und bezogen auf die durch Spaltung und Nachspaltung in lösliche Form gebrachte Radioaktivität 37 %.

TAB.8 GESAMTAUSBEUTE ALLER 3- ^{14}C - MALONYLPEPTIDE

AUSBEUTE	PEPTID			
	I	IIA	IIB	NACHSPALTUNG
ABSOLUTMENGE [nMOL]	200	140	6	40
% DER GESAMTEN PROTEINGEBUNDENEN RADIOAKTIVITÄT	17	12	0,5	3
% DER GESAMTEN LÖSLICHEN RADIOAKT. (NACH 2 SPALTUNGEN)	20	14	0,6	4

Ein spezifischer Verlust einzelner Peptide scheint nicht für den Verlust von etwa 69 % radioaktiven Materials verantwortlich zu sein. Vielmehr ist es zum einen die schwere Spaltbarkeit des "Cores" durch Trypsin sowie zum anderen die notwendige Kombination mehrerer Anreicherungsschritte mit der jeweils unter 100 % liegenden Wiederfinderate, die sich bemerkbar macht. Lediglich 18 nMol definiert auftretenden Materials werden aus Substanzmangel ohne weitere Charakterisierung verworfen.

Die Aminosäurezusammensetzung der Peptide ist ähnlich. Neben den in der Pentapeptidfraktion (IIa und Nachspaltung) auftretenden Aminosäuren enthält IIb zusätzlich ein Äquivalent Alanin, I zusätzlich 3 Äquivalente Alanin und 1 Äquivalent Leucin. Dies ergibt den Verdacht, daß die kleineren Peptide durch weitergehenden Abbau aus dem größeren entstehen.

Keines der isolierten Peptide enthält eine basische Aminosäure, obwohl die Verwendung der Protease Trypsin das Auftreten eines Lysins oder Arginins hätte erwarten lassen. Die Erklärungsmöglichkeit, daß alle Peptide vom C-terminalen Bereich der Polypeptidketten stammen, erscheint angesichts der angenommenen Abstammung aus dem aktiven Zentrum als eher unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher liegt nicht-typisches Spaltverhalten der Protease vor, da sowohl in den Arbeiten von Ziegenhorn und Kresze (34,59) nach tryptischer Spaltung Peptide ohne basische Aminosäuren isoliert worden sind, jedoch insgesamt nur zwei C-Termini in FSS vorhanden sind (60). Diesen Arbeiten wie der vorliegenden ist gemeinsam, daß hohe Mengen Trypsin über lange Zeitdauer zur Anwendung kamen. Eine Deutung des Spaltverhaltens kann durch die Annahme gegeben werden, daß das (TPCK-behandelte) Trypsinpräparat nicht-chymotryptische Fremdproteasen enthält (von Kresze wird die Anwesenheit von Elastase diskutiert (61)), oder daß es eine geringe, nicht gegen Arginin oder Lysin gerichtete Eigenspaltaktivität besitzt (62), die erst unter extremen Mengen- und Zeitbedingungen zum Ausdruck kommt.

3.2. Strukturermittlung

3.2.1. N-terminale Analyse

Ein Kriterium für die Einheitlichkeit eines Peptids ist das Auftreten einer einzigen N-terminalen Aminosäure bei der Endgruppenanalyse nach Gray und Hartley (63,64). Bei diesem Verfahren werden freie NH_2 -Gruppen wie die N-terminale Aminosäure eines Peptids und die ϵ - NH_2 -Seitengruppe von Lysin sowie die tyrosinische OH-Gruppe durch Reaktion mit Dansylchlorid (DNS-Cl) in säurestabile, fluoreszierende Dansyl (DNS)-Derivate überführt. Nach salzsaurer Hydrolyse werden die gegebenenfalls auftretenden DNS-Aminosäuren auf doppelseitig beschichteten Polyamidplättchen identifiziert. Mit den von uns verwendeten Dünnschichtplatten gelingt die Trennung aller zu erwartenden DNS-Derivate auf Platten der Größe 3 x 3 cm. Günstige Nachweis Mengen sind 20-50 pMol/DNS-Aminosäure. Obwohl mit Modellpeptiden der Nachweis der Endgruppen ausgehend von einem nMol Insulin oder Glukagon mühelos gelingt, zeigt sich auf den Dünnschichtplatten bei der Endgruppenanalyse der angereicherten Peptide nur der tiefgelbe Fleck von O-DNS-Tyrosin neben Spuren von DNS- NH_2 und großen Mengen DNS-OH. Ein Auftreten von O,N-bis-DNS-Tyrosin selbst unter den basischeren Bedingungen von Tamura (65) wird nicht beobachtet. Die Experimente zeigen, daß

1. keine verunreinigenden Fremdpeptide vorhanden sind
2. der N-Terminus der Peptide vermutlich blockiert ist, dies deckt sich mit der Erfahrung, daß die radioaktiven Peptide auf Papier mit Ninhydrin, Fluram oder o-Phtalaldehyd nicht nachgewiesen werden können.

In Übereinstimmung mit diesen unerfreulichen Befunden zeigt ein Verdauungsexperiment mit Leucinaminopeptidase, daß unter Bedingungen, unter denen aus Glukagon weit mehr als nur die N-terminale Aminosäure freigesetzt wird, aus dem Malonylpentapeptid keine Aminosäure freigesetzt wird (s. Experimenteller Teil).

Über den Mechanismus der N-terminalen Blockierung kann vorläufig nichts ausgesagt werden; da die Peptide die Aminosäure Glx enthalten, ist z.B. als N-terminale Aminosäure Pyrrolidoncarbon-

säure vorstellbar. Wichtige Konsequenz ist, daß ohne weitere Information der schrittweise Abbau der Peptide nach Edman (66), die gebräuchlichste Methode der Sequenzbestimmung unmöglich ist.

3.2.2. Sequenzierung von IIa mit Carboxypeptidasen

Um Einblicke in Teile der Primärstruktur zu gewinnen, wird versucht, Aminosäuren vom C-Terminus durch Exopeptidasen (Carboxypeptidasen) abzuspalten. Die Aussagen, die aus diesem kontinuierlichen Abspaltungsverfahren über die Anordnung von Aminosäuren gewonnen werden können, sind zwar limitiert, und in vielen Fällen unzuverlässiger als beim diskontinuierlichen Edman-Abbau (67), jedoch scheint zumindest Peptid IIa mit seinen 5 verschiedenen Aminosäuren günstige Voraussetzungen für die Anwendung des Verfahrens zu bieten.

Ambler (68) beschreibt 6 verschiedene Varianten der Sequenzanalyse mit Carboxypeptidasen. Aus Gründen der Materialersparnis werden in der vorliegenden Arbeit in allen Experimenten zu variablen Zeiten Aliquote der Reaktionsmischung entnommen und die freigesetzten Aminosäuren mittels eines Aminosäureanalysators bestimmt.

Nach Vorversuchen mit Carboxypeptidase C (aus Citrusfrüchten, 69) und A (aus Rinderpankreas, 62) steht lediglich fest, daß Tyrosin die C-terminale Aminosäure des Peptids sein muß. Weitere Aminosäuren werden nicht (CPC) oder in nur schwer unterscheidbarer Reihenfolge (CPA) freigesetzt. Eindeutige Ergebnisse ergibt die Anwendung der Hefeprotease CPY (70). Das Ergebnis einer Versuchsreihe, ausgeführt mit 27 nMol Pentapeptid und einem Enzym : Substratverhältnis von 1:150 ist auf Abb. 21 dargestellt.

Danach werden vom C-Terminus ausgehend Aminosäuren in der Reihenfolge Tyrosin > Glutaminsäure⁺ > Glycin > Leucin freigesetzt. Weiteres ninhydrinpositives Material - insbesondere mit der Elutionszeit $\leq$ Serin - taucht nicht auf.

+ Die Identifizierung von Glx als Glutaminsäure gelingt im Aminosäureanalysator unter Verwendung des Lithiumcitratpuffersystems

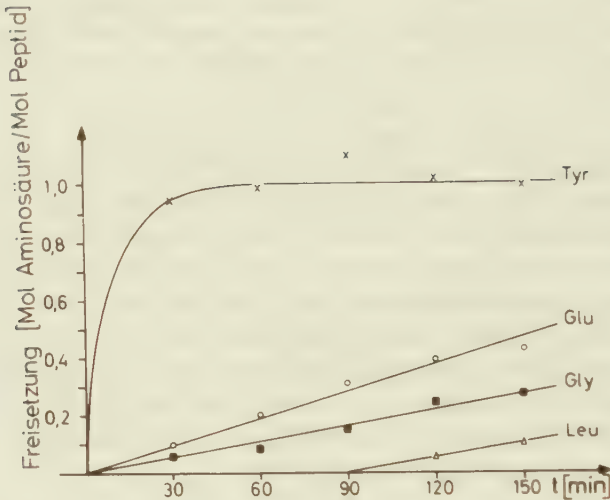


Abb. 21 : Kinetik der Freisetzung von Aminosäuren aus dem C-Malonylpeptid IIa durch CPY

27 nMol IIa, 11 µg CPY (180 pMol)
 Enzym: Substratverhältnis = 1:150, T = 37°C
 V = 240 µl, 0.1 M Pyridin-Acetat, pH 5.5; Entnahme von je 40 µl bei t = 30-150 min. Aufarbeitung s. 7.3.13

Da die frühe, C-terminale Freisetzung von Glutaminsäure zeigt, daß als N-terminale Aminosäure Pyrrolidincarbonsäure nicht in Betracht kommt, ergibt sich die Vermutung, daß N-Malonyl-Serin, entstanden durch O→N-Acylverschiebung aus O-Malonyl-Serin, N-terminale Aminosäure ist. Dementsprechend zeigt die Fraktionierung und Radioaktivitätsbestimmung des Eluats des Aminosäureanalysators, daß bei langen Verdauungszeiten mit einer Elutionszeit von 10-15 Min. (Asp = 40 Min.) radioaktives, ninhydrin-negatives Material eluiert wird. Dieses wird von den Sulfonatgruppen des Ionenaustauscharztes nicht mehr verzögert. Dies sollte man aber von der Dicarbonsäure N-Malonylserin erwarten, da sie wesentlich saurer ist als etwa die Monoaminodicarbonsäure Asp. Die enzymatische Spaltung eines im Verlauf der Carboxy-

peptidasereaktion aus dem Pentapeptid entstehenden Dipeptids N-Malonyl-Ser-Leu läßt erwarten, daß pro Mol freigesetztes Leu ein Mol radioaktives Malonylserin eluiert wird. Überraschend ist zunächst, daß die gefundene Menge ^{14}C -Malonylserin unterstöchiometrisch ist, verständlich wird dies, wenn man berücksichtigt, daß die im Aminosäureanalysator durchgeführte Ninhydrinreaktion 15-minütiges Erhitzen des mit Ninhydrin gemischten Säuleneluats in einem Reaktions-"Coil" (Flußreaktor) auf 100°C beinhaltet. Eine Decarboxylierung von 3- ^{14}C -Malonylserin zu $^{14}\text{CO}_2$ und nicht radioaktivem Acetylserin muß also erwartet werden. Die weiteren Versuche dienen dazu die angenommene Struktur N-Malonyl-Ser-Leu-Gly-Glu-Tyr des Pentapeptids IIa insbesondere die Natur der Akzeptorgruppe des Malonylrests zu beweisen.

3.2.3. Thermolysinfragmentierung - die Natur der Akzeptorgruppe

Die eindeutige Lokalisierung von Malonsäure auf Serin erscheint durch spezifische Fragmentierung des Peptids denkbar. Auf Grund obiger Strukturannahme wird die Protease Thermolysin (71) aus dem thermophilen Bakterium *Bacillus thermoproteolyticus* verwendet, da diese Protease Proteine und Peptide sehr spezifisch an denjenigen Peptidbindungen spaltet, deren Aminogruppe von Aminosäuren mit großen, hydrophoben Seitenketten stammt. Die verbliebene Menge Pentapeptid wird 2 Stdn. bei 37°C mit Thermolysin (Enzym:Substratverhältnis = 1:52) inkubiert. Die Reaktion wird durch Ansäuern, Zentrifugation und Lyophilisation beendet, die entstandenen Spaltstücke werden dünnschichtchromatographisch getrennt. Lokalisierung der Banden geschieht durch Autoradiographie und - nach Besprühen der ganzen Platte mit einer verdünnten Fluramlösung (72) - anhand der Fluoreszenz. Die sehr geringe Menge Fluram in der Sprühlösung reagiert mit den Aminoendgruppen der Peptide an der Oberfläche der Dünnschichtplatte ab. Die Endgruppen der darunterliegenden Moleküle bleiben unblockiert und damit reaktiv für den geplanten Edman-Abbau.

Aus Abb. 22 geht hervor, daß eine Auftrennung in drei Komponenten erreicht wird. Die charakteristischen Merkmale der Komponenten sind in Tab. 9 dargestellt. IIa Th II ($R_f = 0,5$) ist dem-

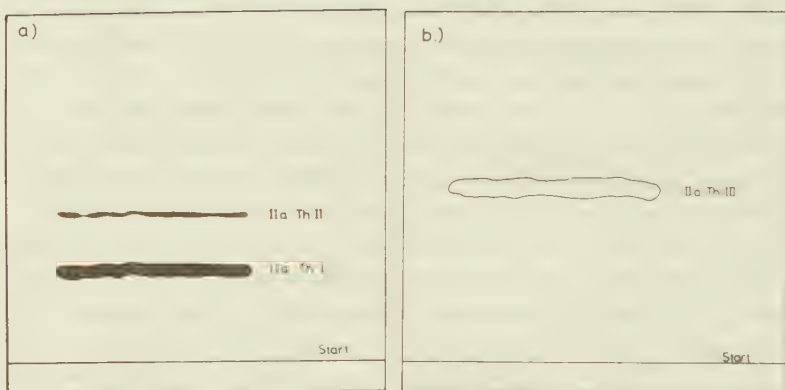


Abb. 22: Auftrennung der durch Thermolysin gewonnenen Produkte durch Dünnschichtchromatographie

a) Autoradiogramm b) Fluoreszenz nach Besprühen mit Fluoramreagenz
System: Kieselgel-LM F, Laufzeit 4.5 h; Probe: 2 nach Spaltung
vereinigte Ansätze à 40 nMol Ausgangsmaterial

Tab. 9: Charakterisierung der nach Thermolysin-Fragmentierung von Peptid IIa durch Dünnschichtchromatographie isolierten Komponenten

PEPTID	IIa Th I	IIa Th II	IIa Th III
Rf WERT	0,3	0,5	0,6
ZUSAMMEN- SETZUNG	SER	WIE IIa	GLX, GLY, LEU, TYR (1,0:1,1:1,0:0,9)
ENDGRUPPE	-	-	LEU
RADIOAKTIVITÄT	+	+	-

nach unverdautes Ausgangsprodukt. IIa Th I ($R_f = 0,3$) enthält die Radioaktivität der ^{14}C -Malonsäure, besitzt keinen freien N-Terminus (fluramnegativ!) und ergibt nach Hydrolyse als einzige Aminosäure Serin. Das Verhältnis von Malonsäure (bestimmt anhand der Radioaktivität) zu Serin (bestimmt anhand der Aminosäureanalyse) beträgt etwa 1:1. Die einzige Substanz, die diesen Daten in diesem Zusammenhang gerecht wird, ist N-Malonyl-Serin. Die angenommene Bildung dieser Verbindung aus der ursprünglichen Verbindung O-Malonyl-Serin wird im Zusammenhang an anderer Stelle diskutiert.

Peptid IIa Th III ($R_f = 0,6$) (nicht radioaktiv, flurampositiv) ist offenbar das von Malonyl-Serin abgespaltene Restpeptid. Dansylendgruppenanalyse beweist die auf Grund der Proteasespezifität erwartete Anwesenheit von Leucin als einziger Aminosäure. Die Sequenz dieses Materials wird durch Edman-Abbau ermittelt.

3.2.4. Edman-Abbau von IIa Th III - die Struktur von IIa

Der Edman-Abbau ist mehrfach beschrieben (67,72-74). Auch im hiesigen Arbeitskreis sind Erfahrungen mit der experimentellen Durchführung gesammelt worden. Das im folgenden Gesagte soll auch im Hinblick auf die später beschriebene Festphasenvariante der Erinnerung dienen. Im ~~Edman-Abbau~~ wird ein Peptid, vom N-Terminus ausgehend, in je 2 Schritten um je eine Aminosäure verkürzt:

1. Die Kupplung des Peptids erfolgt mit Phenylisothiocyanat (PITC) im alkalischen Bereich unter Bildung eines Phenylthiocarbamylderivats (PTC-Peptids).
2. Die Spaltung des PTC-Peptids wird durch wasserfreie Säuren katalysiert und ergibt neben dem Phenylthiazolinon der terminalen Aminosäure das um eine Aminosäure verkürzte Restpeptid.

Die Entfernung überschüssiger Reagenzien in Schritt 1 und die Extraktion des Phenylthiazolinons nach Schritt 2 geschieht jeweils durch organische Lösungsmittel, durch die das Peptid im

allgemeinen nicht gelöst wird. Das instabile, für eine Identifizierung ungeeignete Phenylthiazolinon wird in einem separaten Schritt zu einem stabilen Phenylthiohydantoin (PTH)-Derivat umgelagert. Im Idealfall werden in einem Abbauschritt 100 % aller Peptidmoleküle um eine Aminosäure verkürzt, in der Praxis können unter den 'Fast-Idealbedingungen' der automatischen Sequenzanalyse nach Edman und Begg (75) repetitive Ausbeuten über 97 % erreicht werden. In dieser Arbeit verwendeten manuellen Verfahren sind die Ausbeuten wesentlich geringer. Die Durchführung folgt den Angaben von Schreckenbach (15), die eine Kombination von mehreren Arbeitsweisen ist. Zur Identifizierung werden drei Verfahren herangezogen.

1. Ein Teil der PTH-Aminosäuren jedes Schritts wird auf hochauflösenden Kieselgel-Dünnschichtplatten chromatographiert. Die verwendeten Laufmittel und Nachweisverfahren (Fluoreszenzlöschung oder Calcein-PdCl₂-Sprühreagenz) sind exakt identisch mit den von Kresze beschriebenen (61).
2. Ein weiterer Teil der PTH-Aminosäuren, oder auch ein Aliquot des Phenylthiazolinon-Derivats wird nach reduktiver Hydrolyse durch Aminosäureanalyse identifiziert (76).
3. In einzelnen Fällen wird vor Beginn eines Abbauschrittes ein Aliquot des Peptids entnommen und Dansylendgruppenanalyse durchgeführt.

Tab. 10: Edman-Abbau von Peptid IIa Th III

STUFE	PTH-AMINOSÄURE (DC)	RÜCKHYDROLYSE	DNS-AMINOSÄURE
1	LEU	LEU	LEU
2	GLY	GLY	N.B.
3	GLU (GLY)	GLU (GLY)	GLU (GLY)
4	-	-	TYR

Die daraus abgeleitete Sequenz entspricht exakt den Daten aus den Carboxypeptidasereaktionen. Für Peptid IIa gilt damit die Struktur N-Malonyl-Ser-Leu-Gly-Glu-Tyr als bewiesen.

3.2.5. Sequenzierung von Peptid I mit CPY

Da auch Peptid I keinen freien N-Terminus besitzt und die C-terminale Sequenzbestimmung von Peptid IIa mit CPY eine korrekte Anordnung der Aminosäuren ergibt, wird dieses Verfahren auch auf Peptid I angewandt.

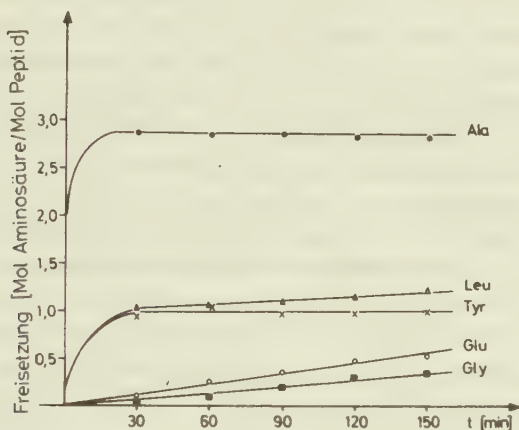


Abb. 23: Kinetik der Freisetzung von Aminosäuren aus dem C-Malonylpeptid I durch CPY

24 nMol I, 11 µg CPY (180 pMol).

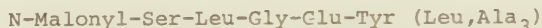
Enzym: Substratverhältnis = 1:133, T = 37° C

V = 230 µl, 0,1 M Pyridin-Acetat, pH 5.5; Entnahme von je 40 µl bei t = 30-150 min.

Aufarbeitung s. 7.3.13

Wie Abb. 23 zeigt, werden in schneller, nichtunterscheidbarer Reihenfolge drei Äquivalente Alanin sowie ein Äquivalent Leucin und Tyrosin freigesetzt, gefolgt von der langsamen Freisetzung von Glutaminsäure, Glycin und weiterem Leucin. Wie bei Peptid IIa wird kein ninhydrinpositives Material mit der Elutionszeit

≤ Serin eluiert. Peptid I ist also offensichtlich ein Vorläuferpeptid zu obigem Pentapeptid; da alle gegenüber dem Pentapeptid überzählig vorhandenen Aminosäuren zusammen mit Tyrosin freigesetzt werden und das Peptid keinen freien N-Terminus hat, wird die Struktur



angenommen.

3.2.6. Protease-V-8-Fragmentierung - Fragmentisolation

Spezifische Fragmentierung soll diese Struktur beweisen und die Festlegung der Reihenfolge der C-terminalen Aminosäuren ermöglichen. Für diesen Zweck erscheint die Verwendung von Thermolysin weniger günstig, da neben den Spaltungen an den Aminosäuren Leucin auch Spaltungen von Peptidbindungen beschrieben sind, deren Aminogruppe von Alanin stammt (71). Da das Peptid freie Glutaminsäure enthält, wird es mit der Protease V-8 aus *Staphylococcus aureus* fragmentiert. Diese Serinprotease spaltet Peptide nach Angaben von Houmard und Drapeau (77) je nach pH und Pufferbedingungen bei Asparaginsäure und Glutaminsäure oder nur bei Glutaminsäure. In 50 mM Ammoniumacetatpuffer pH 4.0 werden nur die Peptidbindungen gespalten, deren Carboxylgruppe von Glutaminsäure stammt. Dieser Puffer wird verwendet.

In einem Vorversuch werden günstige Spalt- und Fragmenttrennbedingungen festgelegt. In zwei Ansätzen werden dann je 60 nMol Nonapeptid mit je 3 nMol Protease V-8 20 Std. inkubiert ($T = 37^\circ \text{C}$). Die Reaktion wird durch Ansäuern und Lyophilisation beendet.

Da im Vorversuch die dünnschichtchromatographische Trennung der Spaltstücke im üblicherweise verwendeten Lösungsmittel F nicht gelingt, jedoch elektrophoretische Unterschiede der Spaltstücke zu erwarten sind, da andererseits nur geringe Mengen Peptid zur Verfügung stehen, wird als Trennmethode der Wahl die Dünnschichtelektrophorese auf mit mikrokristalliner Cellulose (0.1 mm) beschichteten Kunststoffplatten (73) herangezogen. Die Auftrennung

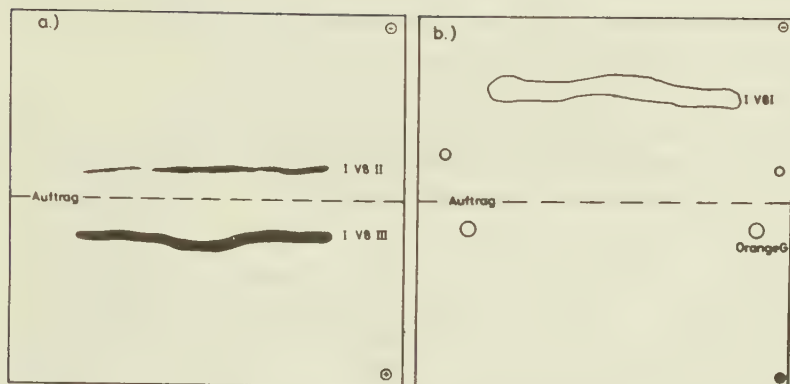


Abb. 24: Auftrennung des Protease-V-8-Spaltgemischs von Peptid I durch Dünnschichtelektrophorese, pH 4.6

a) Autoradiogramm b) Fluoreszenz nach Besprühen mit Fluram-reagenz

Mikrokristalline Cellulose (Cel 400), 20 x 20 cm, Puffer = LM C; 400 V, 18 mA; Laufzeit 2 h 20 min

Probe: entsprechend 60 nMol Ausgangsmaterial

der Peptide eines Spaltansatzes ist in Abbildung 24 dargestellt; 3 Komponenten können in derselben Weise wie bei der Dünnschichtchromatographie (s. Kapitel 3.2.3.) lokalisiert und durch Elution der von der Platte gekratzten Zonen mit Puffer isoliert werden.

Die Aminosäurezusammensetzung dieser Peptide ist in Tab. 11, die Charakterisierung anhand von Radioaktivität, Bruttozusammensetzung und Endgruppenverhalten ist in Tab. 12 angegeben.

TAB.11 AMINOSÄUREZUSAMMENSETZUNG DER NACH PROTEASE- V- 8
VERDAUUNG VON ^{14}C - MALONYLPEPTID I DURCH DÜNNESCHICHT-
ELEKTROPHORESE ISOLIERTEN PEPTIDE

AMINOSÄURE	AMINOSÄUREÄQUIVALENTE / ÄQUIVALENT PEPTID		
	I- V- 8- I	I- V- 8- II	I- V- 8- III
ASX, CM-CYS	-	-	
THR	-	-	
SER	SPUREN	1,2	0,9
GLX	-	1,2	1,0
PRO	-	-	-
GLY	SPUREN	1,1	1,1
ALA	3,0	2,7	-
VAL	-	-	-
MET	-	-	-
ILE	-	-	-
LEU	1,0	1,8	1,0
TYR	1,0	1,1	-
β -ALA	-	-	-
PHE	-	-	-
LYS	-	-	-
HIS	-	-	-
ARG	-	-	-

TAB.12 CHARAKTERISIERUNG DER NACH V-8- FRAGMENTIERUNG VON
PEPTID I DURCH DÜNN SCHICHTELEKTROPHORESE GEWONNENEN
PEPTIDE

PEPTID	I-V-8-I	I-V-8-II	I-V-8-III
ZUSAMMEN- SETZUNG	ALA ₃ , LEU, TYR	WIE I	SER, LEU, GLY, GLU
MENGE [nMOL]	50	17	60
ENDGRUPPE	TYR	-	-
RADIOAKTI- VITÄT	-	+	+

Offensichtlich ist I-V-8-II nichtgespaltenes Ausgangsprodukt, I-V-8-III ist das Peptid N-Malonyl-Ser-Leu-Gly-Glu und I-V-8-I das davon abgespaltene Restpeptid, dessen N-terminale Aminosäure erwartungsgemäß Tyrosin ist. Dieses Pentapeptid wird nach Edman abgebaut. Da auf Grund des hydrophoben Aufbaus des Peptids Extraktionsverluste bei den Abbauschritten zu befürchten sind, wird als inerte Träger vollständig succinyliertes und damit N-terminal blockiertes Rinderserumalbumin verwendet. Die Verwendung von Trägern in der Mikrosequenzanalyse von in nur geringer Menge isolierbaren Peptiden oder Proteinen ist mehrfach beschrieben (79-83). Außer N-terminal blockierten Proteinen und Protein-analoga wie Succinyl-Poly-Ornithin können Proteine bekannter Sequenz sowie SDS verwendet werden.

Der Verlauf der Sequenzanalyse mit 50 nMol des Peptids I-V-8-I ist in Tabelle 13 dargestellt. Neben der Angabe der identifizierten Reste ist die halbquantitative auf 100 % umgerechnete Auswertung der Rückhydrolysedaten für den 1. Rest angegeben.

Zwei Punkte sind erwähnenswert:

1. Obwohl alle Aminosäuren des Peptids hydrophob sind, läßt sich die Sequenz eindeutig bis zur letzten Aminosäure bestimmen, 'carry over' und Extraktionsverluste sind gering,

TAB.13 VERLAUF DER SEQUENZANALYSE DES PEPTIDS I-V-8-I

SCHRITT	DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE		RÜCKHYDROLYSE
	PTH-	DNS- AMINOSÄURE	AMINOSÄURE (nMOL)*
1	Tyr	Tyr	Tyr (15)
2	ALA	N.B.	ALA, SPUREN Tyr
3	ALA	N.B.	ALA
4	LEU	N.B.	LEU
5	ALA	N.B.	ALA, SPUREN LEU

* DIE nMOL-MENGE IST ANHAND EINES ALIQUOTS BESTIMMT UND AUF 100% UMGERECHNET; SIE IST UNKORRIGIERT BEZÜGLICH DESTRUKTIVER VERLUSTE WÄHREND DER REDUKTIVEN HYDROLYSE

der Vollständigkeit halber sei erwähnt, daß die gefundene Sequenz vollständig verschieden ist von der N-terminalen Sequenz von Rinderserumalbumin.

2. Obwohl nach Berechnung über die Aminosäureanalyse 50 nMol Peptid in den Abbau eingesetzt worden sind, tauchen im ersten Schritt nur 15 nMol Tyrosin auf. Dies bedeutet, daß ein größerer Teil des Peptids - vermutlich durch die zum Nachweis auf der Dünnschichtplatte benutzte Fluramreaktion blockiert ist.

Durch Kombination der geschilderten Daten ergibt sich damit für Peptid I die Sequenz

N-Malonyl-Ser-Leu-Gly-Glu-Tyr-Ala-Ala-Leu-Ala.

3.2.7. Struktur von Peptid IIb

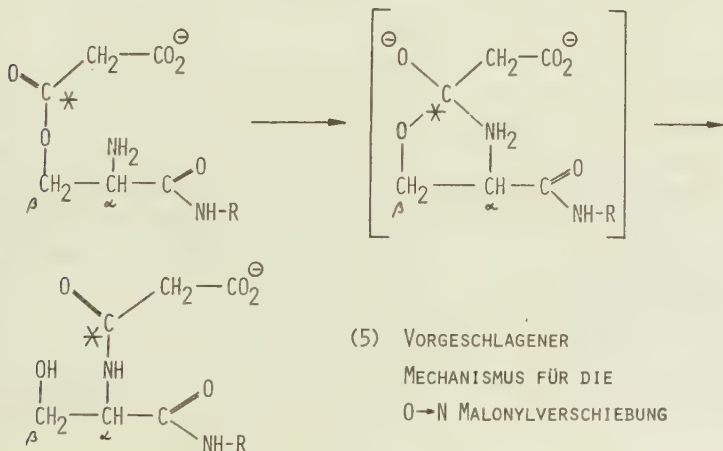
Nach mehreren vergeblichen Versuchen, eine Endgruppe in diesem Peptid nachzuweisen, steht für dieses in geringer Menge isolierte Peptid lediglich die Aminosäurezusammensetzung und die Blockierung des N-Terminus fest. Nach den bisher beschriebenen Daten ist die Struktur N-Malonyl-Ser-Leu-Gly-Glu-Tyr-Ala sehr naheliegend, wenngleich nicht streng bewiesen.

3.2.8. Zum Mechanismus der Acylumlagerung

Nach Josefson und Edman (85) lagert O-Acetyl-Serin in wässriger Lösung bei pH 7.5 zu N-Acetyl-Serin um. Die Untersuchung der Umlagerung des ^{14}C -Acetylanalogs in Gegenwart von unmarkiertem Acetat zeigt streng den intramolekularen Verlauf der Reaktion und macht die Beteiligung eines Oxazolinons wahrscheinlich (86).

Diese Befunde werden durch Ergebnisse von Ziegenhorn (34) bestätigt, die zeigen, daß in Peptiden mit endständigem ^{14}C -O-Acetyl-L-Serin der Acetylrest eine $\text{O} \rightarrow \text{N}$ Acylverschiebung eingeht.

In Analogie zu diesen und weiteren (87) Daten wird für die Blockierung des N-Terminus in den ^{14}C -Malonylpeptiden folgender Mechanismus vorgeschlagen (Gl. 5):



Triebkraft der Reaktion ist die Ausbildung der gegenüber der Esterbindung viel stabileren Amidbindung über einen sterisch fast ungehinderten, fünfgliedrigen Ring. Der Vorschlag wird durch mehrere Tatsachen gestützt.

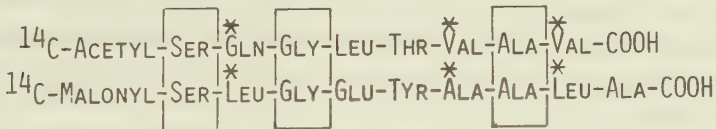
1. Eine Reaktion nach diesem Schema sollte bedingt durch den negativ-induktiven Effekt der Carboxylgruppe des Malonylrests statt des H-Atoms des Acetylrests noch schneller ablaufen als bei Acetylserin (erhöhte Elektrophilie der $^+C=O$ -Gruppe).
2. Auf Grund der hohen Ausbeuten, mit der die N-Malonylpeptide isoliert werden, muß die Bildung dieser Verbindungen hochspezifisch abgelaufen sein. Da andererseits erst die proteolytische Freisetzung der α -Aminogruppe die für die Umlagerung nötigen Voraussetzungen schafft, kann der Malonylrest vor der Umlagerung nur auf Serin oder den C-terminal darauf folgenden, nächsten Aminosäuren gebunden gewesen sein. Dies sind jedoch mit Leucin und Glycin zwei Aminosäuren, die nicht als Acylakzeptor in Frage kommen.
3. Die Struktur der Peptide ist - wie unten gezeigt werden wird - leicht mit früheren Peptiden kombinierbar. Danach kann jedoch eine Malonylumlagerung in jenen Peptiden nicht stattgefunden haben. Eines dieser Peptide teilt mit den obigen Peptiden als einzig mögliche, ursprüngliche Akzeptor-aminosäure das Serin.

Die geschilderten Punkte lassen ein intensives Studium der Umlagerung unter Verwendung von Malonylmodellpeptiden als überflüssig und wenig reizvoll erscheinen, da zwingend naheliegt, daß der Acylrest ursprünglich auf der OH-Gruppe des Serins gebunden ist, und daß der N-Terminus der isolierten ^{14}C -Malonylpeptide durch $\beta \rightarrow \alpha$ -Acylverschiebung innerhalb derselben Aminosäure blockiert wird.

3.2.9. Diskussion

Durch Kombination mehrerer Methoden können Peptide aus dem aktiven Zentrum der Malonyltransferase isoliert und sequenziert werden. Der aus der Aminosäurezusammensetzung genährte Verdacht, daß alle Peptide aus demselben Primärstrukturabschnitt stammen, bestätigt sich. Das größte isolierbare Peptid wird offenbar im Verlauf der Spaltung zum Teil zu den kleineren Peptiden weiter abgebaut. Da keinerlei Anzeichen für verschiedenartige Malonylbindungsstellen existieren, bedeutet dies, daß die Malonyltransferase in mindestens 4-5 identischen Kopien im Multienzymkomplex vorliegt.

Die Primärstruktur kann über 8 Aminosäuren mit der Primärstruktur eines Peptids aus dem aktiven Zentrum der Acetyltransferase verglichen werden

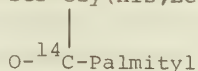
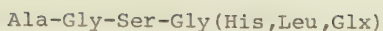


Der Vergleich zeigt:

1. Drei Aminosäuren sind identisch (in Kästchen)
2. Drei weitere Aminosäuren (mit Stern) sind insofern ähnlich, als sich die kodierenden Tripletts des genetischen Codes nur in einer einzigen Base unterscheiden und durch Punktmutation austauschbar sind.
3. Zwei Aminosäuren sind ganz verschieden.

Auffallend ist eine Häufung hydrophober Aminosäuren im C-terminalen Bereich des Malonyl-Peptids.

Über eine Strecke von 9 Aminosäuren sind drei Aminosäuren homolog mit dem entsprechenden Abschnitt aus Elastase, aber nur noch zwei homolog mit entsprechenden Sequenzregionen des Trypsins oder Chymotrypsins (84). Im Primärstrukturbereich lassen sich



zeigt überraschenderweise nicht die auf Grund der Daten des Kapitels 2 vielleicht erwartete Sequenzidentität. Da immunologische Daten von Hess (s.u. 88) und genetische Analysen von Schweizer (s.u. 89) darauf hindeuten, daß neben dem funktionellen Zusammenhang zwischen Malonyl- und Palmityltransferase ein enger topologischer Zusammenhang besteht, da demgegenüber die mit 10 nMol P_1 durchgeführte Sequenzanalyse von Schreckenbach eher dürftig beschrieben ist, erscheint eine nochmalige peptidchemische Charakterisierung der Palmityltransferase notwendig.

4. Peptidchemische Charakterisierung der Palmityltransferase

4.1. Allgemeines

Für die Anreicherung von Peptiden, an die direkt (über Cystein oder Serin) oder indirekt (über 4'-Phosphopantethein) ein Palmitylrest gebunden ist, ist in der Vergangenheit das zu erwartende, hydrophobe Verhalten erfolgreich ausgenutzt worden. Ayling (41) beschreibt die Abtrennung der Palmitylpeptide von den übrigen bei der Spaltung von Palmityl-FSS anfallenden Peptiden durch zweifache Verteilungschromatographie an Sephadex G 50. Die Palmitylpeptide werden mit der organischen Phase im Ausschlußvolumen eluiert. Schreckenbach (15) verwendet eine Verteilungschromatographie an Sephadex G 50, daran anschließend wird das Peptidmaterial an Sephadex LH 20 chromatographiert. Beide Autoren trennen dann das Gemisch von Peptiden, die alle einen Palmitylrest tragen, Peptide aus dem ACP, dem kondensierenden Enzym und der Palmityltransferase, durch Dünnschichtchromatographie in die Komponenten. Nach Angaben von Schreckenbach bleiben Peptide aus dem aktiven Zentrum der Palmityltransferase

nach 7-stündiger tryptischer Spaltung im hydrophoben "Core" und können aus diesem mit Pepsin freigesetzt werden. Das im folgenden beschriebene extrem rasche Anreicherungsverfahren wird an zwei Punkten orientiert entwickelt.

1. In der vorliegenden Arbeit ist ausschließlich eine peptid-chemische Charakterisierung der Palmityltransferase von Interesse, nicht jedoch die Isolation von Peptiden aus dem aktiven Zentrum des kondensierenden Enzyms oder das ACPs. Ausgehend von den Ergebnissen zur Beladungsstöchiometrie der Transferasen (s. Kapitel 2) und zur Charakterisierung der Malonyltransferase (s. Kapitel 3) werden daher reaktive SH-Gruppen mit DTNB modifiziert.
2. Die Sequenz eines Palmitylpeptids soll über einen möglichst weiten Bereich mit dem im Kapitel 3 sequenzierten Malonylpeptid verglichen werden. Daher wird das Proteolyseverfahren des letzten Kapitels angewandt. Es wird erhofft, daß die Protease durch identisches Spaltverhalten dieselben Peptidbindungen öffnet wie bei der Malonyl-FSS und daß eine gegenüber den Bedingungen von Schreckenbach mehr als verdoppelte Spaltzeit zur Solubilisierung der erwünschten Peptide führt.

Während sich das im Punkt 1 Gesagte als sehr günstig erweisen wird, müssen später von dem unter Punkt 2 Gesagten Abstriche gemacht werden.

4.2. Markierung der Akzeptorgruppe - Probenvorbereitung - Tryptische Spaltung

FSS (770 mg) wird mit 10^{-3} M DTNB wie früher inkubiert, dann bei 0°C und in Gegenwart von DTNB 15 Min. mit ^{14}C -Palmityl-CoA gerührt. Die Denaturierung und Abtrennung nicht kovalent gebundenen Palmityl-CoAs durch Ionenaustauschchromatographie erfolgt wie in den analytischen Versuchen (s. Exp. Teil). Durch Dialyse gegen 0.5 M Tris-HCl, 6 M Harnstoff, pH 7.0 wird die Pufferkapazität der schwach gelben Proteinlösung erhöht und wie im experi-

mentellen Teil beschrieben carboxymethyliert. Nach ausgiebiger Dialyse wird die opake Lösung mit Trypsin (15 Std, 15 Gew. %, $T = 37^{\circ} \text{C}$) gespalten. Die Reaktion wird durch Ansäuern und Zentrifugation beendet. Der Überstand dieser Spaltung enthält praktisch keine löslichen Palmitylpeptide, auch mit dem Lösungsmittel A (Butanol/ Wasser / 1 % Eisessig, Oberphase) kann selbst bei wiederholtem Waschen nur 7 % radioaktives Material aus dem Niederschlag gelöst werden. Die ursprüngliche Erwartung bezüglich der Spaltspezifität der Protease wird also nicht erfüllt, vermutlich bewirkt der hydrophobe Charakter des gebundenen Palmitylrestes eine Rückfaltung der umgebenden Peptidregion in das hydrophobe "Core" und verhindert die proteolytische Freisetzung eines Palmitylpeptids.

Dementsprechend setzt eine Wiederholung der Spaltung mit 15 Gew.% Trypsin erneut keine wasserlöslichen und weniger als 11 % butanollösliche, radioaktive Peptide frei, da erneut ein unlöslicher Rückstand bleibt. Da bei den zwei Spaltungen jedoch ohne größeren Zeit- und Arbeitsaufwand große Mengen wasserlöslicher Peptide abgetrennt werden, wird das Verfahren als Anreicherungsschritt beibehalten.

4.3. Peptische Spaltung des "Cores"

Im nächsten Schritt wird der unlösliche Rückstand durch Verdauung mit Pepsin unter den von Ayling und Schreckenbach angegebenen Bedingungen (15,41) vollständig aufgelöst, der Spaltansatz mit Butanol extrahiert und die Butanolphase mit der gesamten Radioaktivität nach Verringerung des Volumens hochdruckflüssigkeitschromatographisch untersucht.

4.4. Hochauflösende Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die Entwicklung der hochauflösenden Hochdruckflüssigkeitschromatographie⁺ aus der Gaschromatographie ist eng gekoppelt an die

⁺ Die englische Abkürzung HPLC steht für 'high pressure' oder 'high performance liquid chromatography'.

Entwicklung von nicht kompressiblem Trägermaterial sowie von Detektoren hoher Empfindlichkeit und von Hochdruckpumpen hoher Flußkonstanz (90). Das Interesse an der Methode seit Beginn der 70er Jahre äußert sich an der ständig ansteigenden Zahl von Veröffentlichungen in einschlägigen Journalen. Im Gegensatz zur Gaschromatographie wird die Probe nicht verdampft und in einem Trägergas auf die Säule gespült, sondern in gelöster Form bei Drucken bis etwa 400 atü auf das Trennmaterial gepumpt und mit linearen Flußgeschwindigkeiten von 0.1 bis 5 ml/sec. eluiert. Dies bedeutet, daß auch nicht unzersetzt verdampfbare Stoffe in unveränderter Form chromatographiert werden können. Außer durch übliche, aus der Niederdruckchromatographie bekannte Trennprinzipien wie Adsorption, Verteilung, Gel-Permeation oder Ionenaustausch wird in der Hochdruckflüssigkeitschromatographie inzwischen die Mehrzahl aller Trennprobleme durch Phasenumkehr-(reversed phase, RP-) Chromatographie gelöst. Im Gegensatz zur Verteilungschromatographie ist dabei die mobile Phase polar; die stationäre Phase besteht im allgemeinen aus Kieselgel, an dessen freie OH-Gruppen Alkylgruppen mit 4-18 Kohlenstoffatome kovalent gebunden sind, ist also unpolar. Es ist noch umstritten, ob die Retention zu trennender Substanzen durch hydrophobe Adsorption (91) erfolgt oder durch Verteilung zwischen der polaren Phase und einer durch Wechselwirkung der flüssigen mit der stationären Phase gebildeten Mischphase (92). Erst in letzter Zeit ist außer der Trennung von hydrophoben Peptidderivaten wie Phenylthiocarbamylpeptiden, Dansylpeptiden und flurammodifizierten Peptiden (93-95) auch die erfolgreiche Auftrennung von Gemischen freier Peptide durch RP-Chromatographie beschrieben (96-97). Für die Anreicherung eines Palmitylpeptides erscheint dieses Verfahren ideal, bei Verwendung von Octadecylkieselgel (ODS) als Träger fallen Prinzipien der RP-Chromatographie mit Prinzipien der Affinitätschromatographie zusammen.

4.5. Isolation des Palmitylpeptids

Nach etlichen Vorversuchen zur Festlegung günstiger Trennbedingungen erfolgt die Elution in 50 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 4.0 durch einen Gradienten steigender Konzentration an 2-Propanol. Bei gewissen Zusammensetzungen kommt es in diesem Lösungsmittelsystem zur Schlierenbildung, wodurch die UV-Detektion gestört wird. Da das gesuchte Peptid anhand seiner Radioaktivität nachgewiesen werden kann, wiegt dieser Nachteil gering. Gegenüber häufig empfohlenen Ammoniumacetat-Acetonitril-Systemen, die günstige UV-Eigenschaften haben, bietet Ammoniumacetat-2-Propanol (nicht jedoch H_2O -2-Propanol!) den Vorteil, daß für das radioaktive Material die Wiederfinderaten um ein Vielfaches besser sind (60 % gegenüber 10%).

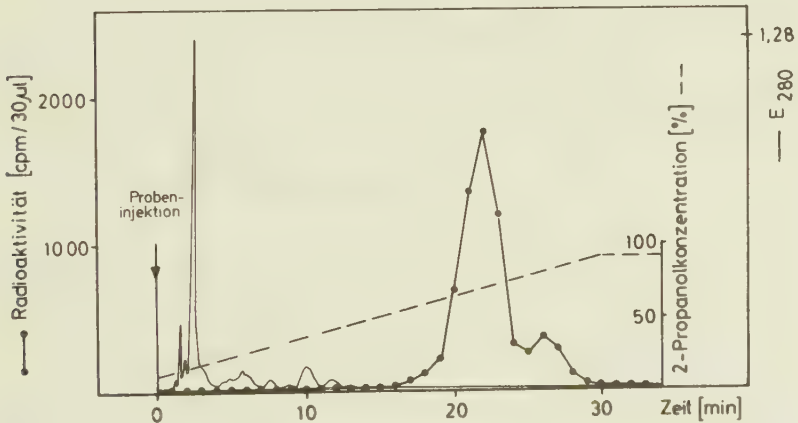


Abb. 25: Hochdruckflüssigkeitschromatographie der nach peptischer Spaltung butanollöslichen Peptide

Säule 0.4 x 25 cm, Spherisorb ODS 10; Gradient: 10-90 % 2-Propanol in 50 mM Ammoniumacetat, pH 4.0 (30 min), dann Endbedingungen (4 min.). Durchfluß 2.0 ml/min; Fraktionsvolumen 2.0 ml.
Probe: Rohes Peptidgemisch, 40 nMol ^{14}C -Palmitylpeptide, 100 µl

Die Abb. 25 zeigt das typische, hochreproduzierbare Elutionsprofil eines Laufs mit einer Peptidmenge, die 40 nMol radioaktive Palmitylpeptide enthält. Offenbar werden erhebliche Mengen nichtradioaktiver Peptide schon bei geringen 2-Propanol-Konzentrationen eluiert, während bei Konzentrationen > 60 % 2-Propanol radioaktives Material von der Säule gewaschen wird, das nach den Kriterien der Ganzzahligkeit der Aminosäurezusammensetzung (s. Tab. 14) und der Einheitlichkeit der Endgruppe ein praktisch analysenreines Heptapeptid mit Ala als Endgruppe ist.

Die Daten stimmen überein mit den Daten, die Ayling für Peptid " 3" und Schreckenbach für Peptid " P₁ " angeben, es dürfte sich also um identische Peptide handeln.

TAB.14 AMINOSÄUREZUSAMMENSETZUNG DES I-¹⁴C- PALMITYLPEPTIDS

AMINOSÄURE	RESTE PRO MOLEKÜL
ASX, CM-CYS	-
THR	-
SER	1,0 (1)
GLX	0,9 (1)
PRO	-
GLY	2,0 (2)
ALA	1,0 (1)
VAL	-
MET	-
ILE	-
LEU	1,1 (1)
TYR	-
β-ALA	-
PHE	-
LYS	-
HIS	1,0 (1)
ARG	-

Bei noch höherer 2-Propanolkonzentration wird als Nebenkompone-
nente ein noch etwas verunreinigtes Peptid eluiert, das sich
nach Dünnschichtchromatographie in LM B anhand seiner Amino-
säurezusammensetzung als Pentapeptid ausweist, das gegenüber
dem Heptapeptid je ein Äquivalent Gly und Glx weniger enthält,
also offensichtlich ein Folgeprodukt weitergehender Spaltung
ist. Die Aminosäurezusammensetzung ist damit identisch mit
der des früher von Schweizer isolierten Methylmalonyl-Pentapep-
tids B₁ (29). Dieses Material wird verworfen, statt dessen
wird das ¹⁴C-Palmitylheptapeptid genauestens charakterisiert.

Ausgehend von 416 nMol eingesetzter Radioaktivität werden durch
Hochdruckflüssigkeitschromatographie 241 nMol ¹⁴C-Palmitylhepta-
peptid (Molekulargewicht = 908), entsprechend 219 µg isoliert.
Ausgehend von der in die Pepsinspaltung eingesetzten protein-
bezogenen Radioaktivität von 150×10^3 cpm/mg, wird durch ein-
fache Butanolextraktion und Hochdruckflüssigkeitschromatographie
ein Wert von 20.9×10^6 cpm/mg, damit also eine 140-fache An-
reicherung erzielt. Der Verlauf der Anreicherung ist in Abb. 26
zusammenfassend dargestellt. Ausbeuten und Anreicherungs fakto-
ren der einzelnen Schritte sind in Tab. 15 zusammengefaßt.

4.6. Festphasen-Edmanabbau

Bedingt durch den peptidgebundenen Palmitylrest ist eine
Erschwerung der Sequenzbestimmung zu erwarten. Das Peptid ist
besser in organischen Lösungsmitteln löslich als in wässrigen
Puffern, daher muß in den beim konventionellen Edmanabbau übli-
chen Extraktionsschritten (s. Kapitel 3.2.4.) schnell mit der
Extraktion und damit dem Verlust des Peptids gerechnet werden.
Der Festphasen-Edmanabbau erscheint das Mittel der Wahl für die
Strukturermittlung zu sein, da diese Methode speziell für die
Sequenzierung kurzer und besonders hydrophober Peptide ent-
wickelt worden ist (98,99,100).

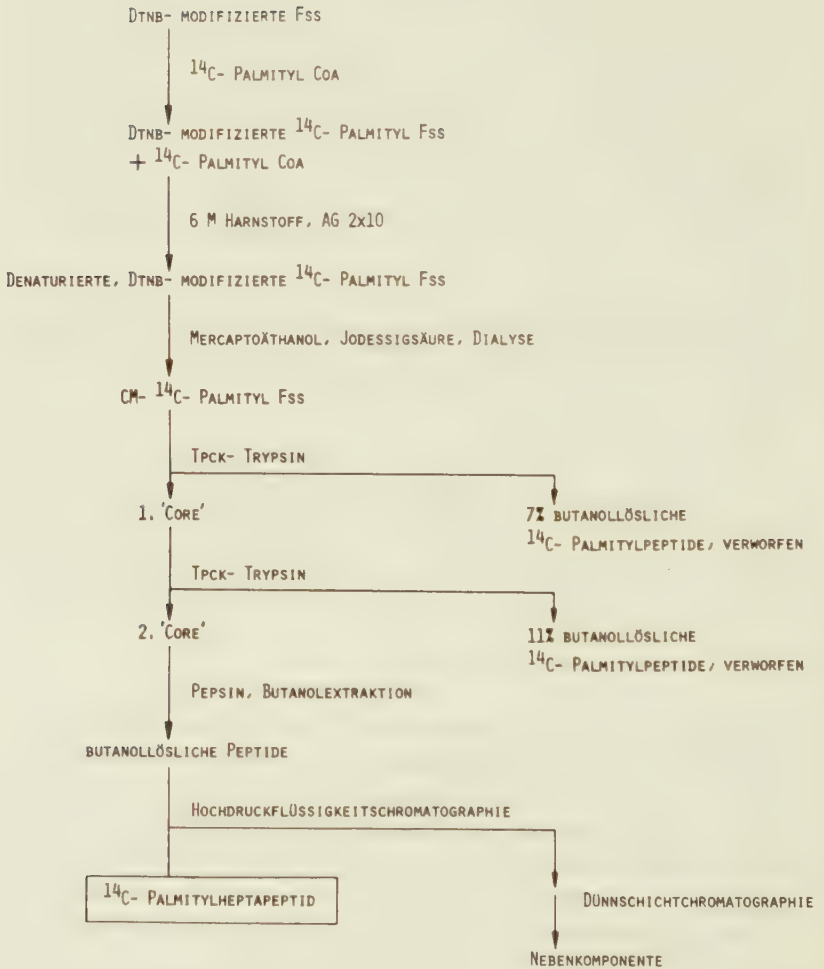


Abb. 26: Anreicherungsschema für $1-^{14}\text{C}$ -Palmitylpeptidmaterial

TAB.15 VERLAUF DER ANREICHERUNG DES 1- ^{14}C - PALMITYLPEPTIDS

PROTEINMENGE [MG]	PROTEINGEBUNDENE RADIOAKTIVITÄT [CPM x 10 ⁻⁶]	NACH SCHRITT	RADIOAKTIVITÄT / PROTEIN [CPM x 10 ⁻³ /MG]	ANREICHERUNG / SCHRITT
685	10,03	AG 2 X 10	14,6	-
133	8,16	2 X TRYPSIN	61,4	4,2
53	7,95	PEPSIN + BUOH- EXTRAKTION	150,0	2,4
0,23	4,82 (0,62)*	HOCHDRUCKFLÜSSIG- KEITSCROMATO- GRAPHIE	20957	140

* DER WERT IN KLAMMER BESCHREIBT EINE NEBENKOMPONENTE, DIE BEI NOCH HÖHERER 2- PROPANOLKONZENTRATION ELUIERT WIRD.

Die Durchführung des Verfahrens erfordert zwei Schritte, nämlich die Immobilisierung des Peptids und den Abbau:

1. Die Kopplung des Peptids an den Träger wird allgemein als der kritischste Schritt des Verfahrens betrachtet, die Kopplungsausbeuten können von 0-100 % variieren (100).

Als Träger werden chemisch modifizierte Derivate, häufig mit freien NH_2 -Gruppen, des Polystyrols (101,102) oder alternativ von porösem Glas (103) verwendet. Etliche Ankopplungsverfahren sind in der Literatur dokumentiert, zum Beispiel die Homoserin-Lactonkopplung (100) oder die Verknüpfung von $\epsilon\text{-NH}_2$ Gruppen von lysinhaltigen Peptiden mittels p-Phenylendiisothiocyanat (100) oder die Kopplung der terminalen freien Carboxylgruppe eines Peptids an NH_2 -Gruppen des Trägers mit einem Carbodiimidreagenz (100).

2. Nach Entfernung der Reagenzien und Bestimmung der Kopplungsausbeute (z.B. durch Aminosäureanalyse eines hydrolysierten Aliquots des Trägers) wird das Peptid in Varianten des Edmanabbaus abgebaut.

Das Verfahren ist alternativ zur "spinning-cup"-Methode automatisiert worden (98,99). Der schrittweise Abbau und die eindeutige Identifizierung der abgespaltenen Aminosäuren eines Peptids über mehr als 70 Schritte wird berichtet (104).

4.7. Sequenz des Palmitylpeptids

In Vorversuchen mit Modellpeptiden (Gly-Leu-Tyr-COOH, Glucagon) werden die günstigsten Reaktionsbedingungen festgelegt. Die Kopplung dieser Peptide an Aminopropylglas⁺ nach Wachter (104)

+ Eine Probe Aminopropylglas (APG) wurde freundlicherweise von Herrn Dr. E. Wachter, Universität München, zur Verfügung gestellt. Sehr dankbar bin ich Frau Dr. B. Wittmann-Liebold, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin, für eine Probe Aminopolystyrol und für die Überlassung einer Laborvorschrift zur Kopplung von Peptiden.

verläuft mit sehr mäßigen Ausbeuten ($< 10\%$), jedoch gelingt die Kopplung an Aminopolystyrol nach den Angaben von Wittmann-Liebold (100,105) auf Anhieb, auch die Sequenzierung verläuft, genügend lange Waschzeiten vorausgesetzt, problemlos.

Daraufhin wird das Palmitylpeptid eingesetzt, die Kopplungs-
ausbeute, bestimmt anhand der harzgebundenen Radioaktivität,
beträgt 85 %. Der Abbau selbst erfolgt in allen Stufen unter
wasserfreien Reaktionsbedingungen nach Previero (106) wie im
experimentellen Teil beschrieben. Die Identifizierung der ab-
gespaltenen Derivate geschieht, wie früher beschrieben (3.2.4.),
durch Dünnschichtchromatographie und - nach reduktiver Hydro-
lyse - durch Aminosäureanalyse. Nach der auf die Umlagerung
des Thiazolinons zur PTH-Aminosäure folgenden Essigesterextrak-
tion werden Aliquote der organischen Phase zur Radioaktivitäts-
bestimmung verwendet und Aliquote der salzsauren, wässrigen Pha-
se nach Pauly (107) auf Histidin geprüft. Der Verlauf der
Sequenzanalyse ist in Tab. 16 angegeben.

TAB.16 VERLAUF DES FESTPHASEN- EDMANABBAUS DES PALMITYLHEPTAPEPTIDS

STUFE	DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE		RÜCKHYDROLYSE		PAULI- REAKTION	CPY
	PTH-	DNS-AMINOSÄURE	AMINOSÄURE	MENGE [NMOL]*		
1	ALA	ALA	ALA	19	-	-
2	GLY	U.B.	GLY	15	-	-
3	-	"	HIS	14	+	-
4	X	"	(SER)	SPUREN	-	-
5	LEU	"	LEU	5	-	LEU
6	GLY	"	GLY	5	-	GLY
7	GLU	"	GLU	1	-	GLU

* AUSWERTUNG HALBQUANTITATIV, UNKORRIGIERT BEZÜGLICH DESTRUKTIVER VERLUSTE

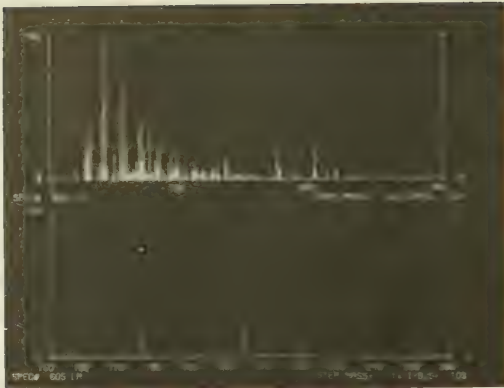


Abb. 27: Massenspektrum der Substanz x

Ordinate: Relative Signalintensität;

Abszisse: Relative Ionenmasse ($\frac{e}{m}$); relative Temperatur = 606.

Unteres Bild: $\frac{e}{m}$ -Skala gespreizt

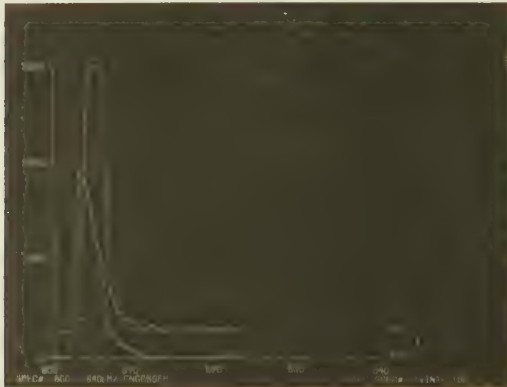


Abb. 28: Massenspektrometrische Registrierung der für Palmitinsäure und PTH-Serin charakteristischen Ionen ($\frac{e}{m} = 256, 204$) in Abhängigkeit von

der Verdampfungstemperatur

Ordinate: Relative Signalintensität, Abszisse: Relative Verdampfungstemperatur

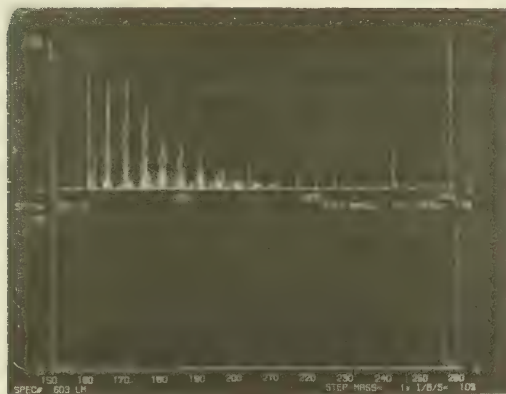


Abb. 29: Massenspektrometrische Identifizierung von Palmitinsäure in Substanz x bei niedriger Verdampfungstemperatur
 Ordinate: Relative Signalintensität
 Abszisse: Relative Ionenmasse $\frac{e}{m}$, im unteren Bild
 gespreizt; relative Temperatur = 603

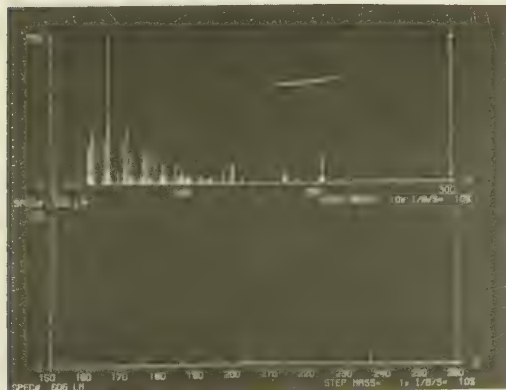


Abb. 30: Massenspektrometrische Identifizierung von PTH-Serin in Substanz x bei hoher Verdampfungstemperatur
 Ordinate: Relative Signalintensität
 Abszisse: Relative Ionenmassen $\left(\frac{e}{m}\right)$, im unteren Bild
 gespreizt; relative Temperatur 605

In Stufen 1 und 2 werden mit Ala und Gly die auch früher von Schreckenbach in "P₁" identifizierten Aminosäuren gefunden. Nach Aussage der Dünnschichtchromatographie ist Schritt 3 scheinbar blockiert, jedoch kann in der wässrigen Phase durch Rückhydrolyse und Aminosäureanalyse Histidin identifiziert werden. Die wässrige Phase ist Pauly-positiv und keinerlei Radioaktivität wird freigesetzt. Nur Histidin, nicht jedoch das von Schreckenbach angegebene Palmitylserin genügt diesen Kriterien. Im 4. Schritt wird das erste Mal eine radioaktive Verbindung freigesetzt. Diese Substanz ist dünnschichtchromatographisch nicht eindeutig identifizierbar; die massenspektrometrische Analyse⁺ eines Aliquots ergibt eine Klärung der Situation. Im Massenspektrum tauchen bei $\frac{e}{m} = 204$ und 256 die für PTH-Serin und Palmitinsäure charakteristischen Ionen auf (159) (Abb. 27). Aufnahme mehrerer Spektren unter Variation der Verdampfungstemperatur zeigt, daß die charakteristischen Ionen nicht bei jeder Temperatur gleichstark auftreten, sondern daß das Signal $\frac{e}{m} = 256$ schon bei niedrigeren Temperaturen als $\frac{e}{m} = 204$ mit maximaler Intensität registriert werden kann (Abb. 28).

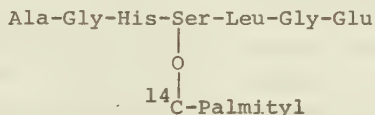
Bei niedriger Temperatur kann dementsprechend das überwiegend der Palmitinsäure entsprechende (Abb. 29), dagegen bei hoher Temperatur das hauptsächlich dem PTH-Serin entsprechende (Abb. 30) Fragmentierungsspektrum beobachtet werden.

Da ein dem PTH-Palmitylserin entsprechendes Molekülion nicht beobachtet wird, läßt dies darauf schließen, daß die Probe aus einem Gemisch von PTH-Serin und Palmitinsäure besteht. Zusammen mit der erstmaligen Freisetzung von Radioaktivität im 4. Abbauschritt bedeutet dies, daß Palmitylserin die 4. Sequenzamino-säure ist, und daß vermutlich während der Umlagerung des Thiazolinons in die PTH-Aminosäure (1 N HCl, 15 min, 80° C) eine Hydrolyse in die gefundenen Komponenten stattfindet.

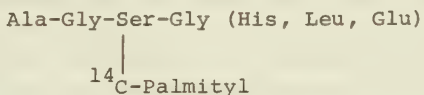
+ Für die Aufnahme und Hilfe bei der Interpretation der Massenspektren bin ich Herrn Dr. Schäfer sehr dankbar.

Der weitere Abbau verläuft klar und eindeutig. Zur experimentellen Stütze der gefundenen Daten wird in einem Experiment eine Probe Palmitylpeptid mit CPY verdaut. Die Exopeptidase setzt je 1 Äquivalent Glu, dann Gly, dann Leu, jedoch keine weiteren Aminosäuren frei. Dies läßt darauf schließen, daß an der viertletzten Position eine ungewöhnliche Substanz steht, eben die Palmitylaminosäure. Da das Palmitylpeptid ein Äquivalent Serin enthält, Serin im Abbau nicht als solches gefunden wird (bei der reduktiven Hydrolyse wird PTH-Serin und vermutlich auch PTH-Palmityl-serin zerstört), ist klar, daß in der 4. Position Palmitylserin stehen muß.

Die Sequenz



gilt damit als bewiesen. Vorausgesetzt, daß das früher isolierte Peptid "P₁" mit diesem Palmitylpeptid identisch ist, muß die von Schreckenbach angegebene Partialsequenz



als falsch betrachtet werden. Darüber hinaus haben die eigenen Arbeiten keinerlei Hinweise für das Vorkommen von Cystein (als CM-Cys) in obigem Peptid oder für das Auftreten eines cysteinhaltigen, größeren Peptids ergeben. Aufgrund der geringen Menge, in der P₂ offenbar früher isoliert worden ist, ferner nach Einsicht in die Originalanalyse von "P₂"⁺ (die bei weitem nicht ganzzahlig ist) und aufgrund obiger Befunde, die zeigen, daß der frühere Strukturvorschlag für "P₁" falsch ist, werden auch die Angaben von "P₂" als inkorrekt betrachtet.

+ Die Originalanalysendaten wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Th. Schreckenbach zur Verfügung gestellt.

Die Untersuchungen an den Palmitylpeptiden zeigen, daß offenbar in FSS aus Hefe nur eine Art von nicht-thiolartigen Akzeptorgruppen für Palmitylreste existiert. Der Vergleich mit den Stöchiometriemessungen des 2. Kapitels zeigt, daß die Palmityltransferase in mehreren identischen Kopien im Komplex vorliegt. Da eine konformative Zerstörung von Transferasen wie im 2. Kapitel geschildert, nicht ausgeschlossen werden kann, muß die Zahl von etwa 4-5 Bindungsstellen mit Vorsicht und vermutlich als Mindestzahl interpretiert werden.

4.8. Zur Existenz einer doppelspezifischen Malonyl-Palmityl-Transferase

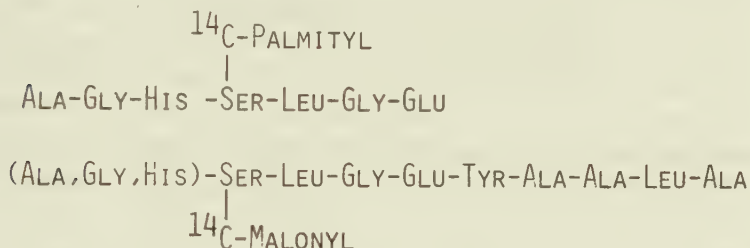
Die im Kapitel 2 geschilderten Untersuchungen zeigen einen engen funktionellen Zusammenhang von Malonyl- und Palmityltransferase und deuten darauf hin, daß nur eine Transferase für die polaren, kurzkettigen Malonylreste und die langkettigen Acylreste vorhanden sein könnte. Dies ist kürzlich durch Experimente von Grauvogl (108) erneut unterstrichen worden, die gezeigt haben, daß die Malonyltransferase durch Palmityl-CoA (unterhalb der kritischen Konzentration der Mizellenbildung) kompetitiv gehemmt wird.

Von Hess (88) durch Immunisierung von Kaninchen gewonnene Antikörper gegen FSS hemmen die Gesamtreaktion auf 40 % des Ausgangswerts. Während die meisten Teilreaktionen intakt sind, wird die Malonyltransferase und die Palmityltransferase im gleichen Ausmaß wie die Gesamtreaktion gehemmt⁺. Dies deutet auf eine enge topologische Beziehung der Transferasen hin, die durch genetische Untersuchungen von Knobling (89) bestätigt wird: Die Untersuchung von FSS-Komplexen aus bezüglich der Gesamtreaktion defekten Hefemutanten zeigt, daß häufig die Hemmung der Gesamtreaktion durch Hemmung einzelner Teilreaktionen erklärt werden kann.

⁺ Eine Hemmung der Bildung von Triacetsäurelaktone des in Abwesenheit von NADPH normalerweise gebildet wird (109), kann durch Hemmung der Malonyltransferase gedeutet werden.

Elf Komplexe der Kopplungsgruppe Vb, die alle stark reduzierte Malonyltransferaseaktivität besitzen, haben auch alle eine stark verminderte Palmityltransferase.

Der Sequenzvergleich des Palmitylpeptids mit dem Malonylpeptid ist in exakter Weise über vier Aminosäuren möglich und zeigt auf dieser Strecke Identität:



Darüber hinaus tauchen die drei Aminosäuren Ala, Gly, His des Malonylpeptids an derselben Stelle und in oben angegebener Reihenfolge im Palmitylpeptid auf. Rein statistisch beträgt die Wahrscheinlichkeit einer Anordnung Ala-Gly-His auch im Malonylpeptid dann 1:6; angesichts der statistischen Möglichkeit, eine beliebige andere Kombination von drei beliebigen Aminosäuren dort anzutreffen (1:8000) muß die gegebene Anordnung damit als sehr wahrscheinlich betrachtet werden. Es ist klar, daß der Peptidabschnitt, über den die Aminosäuren vergleichbar und identisch sind, nicht allzulang ist, auch muß prinzipiell die Möglichkeit im Auge behalten werden, daß Malonyl- und Palmityltransferase aufgrund der ähnlichen Funktion starke Sequenzhomologien im aktiven Zentrum zeigen - wie etwa Trypsin, Chymotrypsin, Thrombin usw. - und dennoch verschiedene Enzyme sind. Gegen die Existenz einer Enzymgruppe "Serintransferasen" spricht jedoch der Umstand, daß das von Ziegenhorn isolierte ${}^{14}\text{C}$ -Acetylpeptid aus der Acetyltransferase nur in sehr geringem Umfang den in Kapitel 3 und 4 vorgestellten Peptiden verwandt erscheint, obwohl das Vorkommen im selben Organismus ja das Finden von Homologien erleichtern sollte.

Daher und durch Kombination der geschilderten Daten muß vermutlich zum gegenwärtigen Zeitpunkt davon ausgegangen werden, daß Malonyl- und Palmityltransferase in dem Sinn identisch sind, daß ein und dasselbe Serin Akzeptorgruppe für Malonyl- und Palmitylreste ist; klar ist, daß über die Orientierung der Acylreste im aktiven Zentrum einer doppelspezifischen Malonyl-Palmityl-Transferase nichts ausgesagt werden kann, es ist jedoch anzunehmen, daß neben der von Sumper angenommenen hydrophoben Erkennungsstrecke für Acylreste mit über 13 C-Atomen eine zweite, positiv geladene Erkennungsregion in unmittelbarer Nähe zur Acylakzeptorgruppe existieren dürfte, die dafür verantwortlich ist, daß wohl Malonylreste, nicht jedoch Acetylreste transferiert werden.

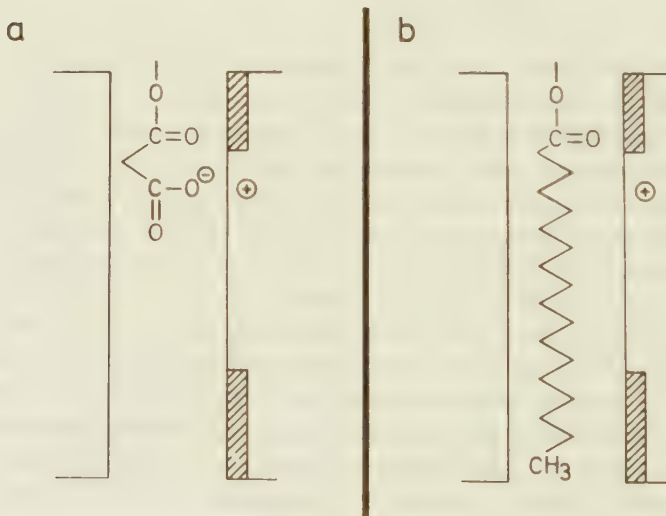


Abb. 31: Modell für die Erklärung der Doppelspezifität der Malonyl-, Palmityl-Transferase

- a) Erkennung eines Malonylrests durch ionische Wechselwirkung
- b) Erkennung eines Palmitylrests über hydrophobe Wechselwirkung

Auf Grund dieser Annahme muß erwartet werden, daß bei weiterer Verfeinerung der genetischen Analyse FSS-Komplexe aus Mutanten isolierbar sind, bei denen ein Defekt in nur einer Erkennungsregion (z.B. hydrophobe Meßstrecke) zum Verlust von nur einer der zwei Funktionen der Malonyl-Palmityl-Transferase führt. Damit lassen sich vielleicht neueste Ergebnisse von Schweizer (110) deuten, nach denen die FSS-Komplexe aus vier verschiedenen Mutanten der Kopplungsgruppe Vb keine Palmityltransferaseaktivität - aber auch nur 0-15 %-ige Kondensationsaktivität - jedoch völlig intakte Malonyltransferaseaktivität besitzen (Mutanten 813, 447, 1329, 883).

Auf die erleichterte Regulierbarkeit des Kettenlängenspektrums der durch FSS gebildeten Fettacylcoenzym A-Verbindungen ist schon früher hingewiesen worden (41). Zwanglos läßt sich die Verschiebung zu längeren Ketten bei einem hohen Malonyl-CoA : Acetyl-CoA-Verhältnis mechanistisch durch eine Erschwerung des Palmityltransfers auf Grund einer Blockierung der Malonyl-Palmityl-Transferase deuten. Schwieriger ist eine experimentell beobachtete (10) Bildung kurzkettiger Fettacyl-CoA Verbindungen mechanistisch zu deuten, da nach dem Vorschlag von Sumper ein Transfer von langkettigen Acylresten erst ab einer Länge von 13 C-Atomen energetisch möglich wird.

Da die prinzipielle Richtigkeit dieser Idee durch Versuche von Grauvogl (108) bestätigt wird, die gezeigt haben, daß der Malonyltransfer durch Acylverbindungen mit weniger als 14 C-Atomen nicht mehr inhibiert wird, da andererseits Versuche von Pirson (111) gezeigt haben, daß als Starter der Fettsäurebiosynthese neben Acetyl-CoA vor allem Nonanoyl und Decanoyl-CoA verwendet werden können, kann man vermuten, daß der Transfer kürzerer Ketten (< ca. 12-14 C-Atome) über die Acetyl-Transferase (bzw. eine Transferase für Acylverbindungen mittlerer Kettenlänge) verläuft.

Durch die Annahme der Existenz einer Malonyl-Palmityl-Transferase werden ältere Experimente von Lust (112) einer Neuinterpretation zugänglich. Nach diesen Experimenten wird FSS durch

Palmityl-CoA gehemmt. Die Hemmung ist kompetitiv in Bezug auf Malonyl-CoA, nicht jedoch Acetyl-CoA oder NADPH. Nicht nur die Konkurrenz um 4'-Phosphopantethein, sondern auch (oder vielleicht hauptsächlich) die Konkurrenz um die Transferase kann dies deuten.

Durch deren Besetzung im Moment des Kettenabbruchs wird der Start der Synthese einer neuen Fettsäure ermöglicht, da in diesem Augenblick die zentrale SH-Gruppe gegen die Besetzung durch einen Malonylrest abgeschirmt ist. Ein Acetylrest kann über sie ungehindert auf die periphere SH-Gruppe gelangen (41).

Nach dem Gesagten darf man gespannt sein auf vergleichende sequenzanalytische Studien von Malonyl- und Palmityltransferase des FSS-Komplexes aus *M. smegmatis*, da dieser Komplex mit Ausnahme des (bimodalen) Produktspektrums und der Beeinflussbarkeit durch Lipopolysaccharide der Hefe-FSS ähnelt.

In höheren Systemen ist die Regulation der Fettsäurebiosynthese sicher anders, da keine Palmityltransferase, sondern eine Palmityldeacylase für den Kettenabbruch verantwortlich ist. Diese läßt sich nicht nur selektiv und unabhängig von Acetyl- und Malonyltransferase mit PMSF hemmen (38,39), sondern sogar - wie durch limitierte Proteolyse mit Trypsin oder Chymotrypsin gezeigt (113) - abspalten, wobei der Restkomplex weiterhin Malonyltransferaseaktivität behält. Bei vergleichbaren Untersuchungen an FSS aus Hefe müßte nach dem Geschilderten ein durch limitierte Proteolyse gewonnenes Spaltstück (Domäne) mit Malonyltransferaseaktivität immer auch Palmityltransferaseaktivität besitzen.

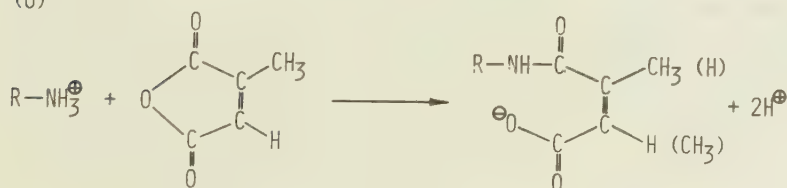
5. Entwicklung eines analytischen Gel-Elektrophorese-systems zur Trennung von Proteinuntereinheiten

5.1. Erschöpfende chemische Modifizierung - Homogenitätsnachweis

Wie in Kapitel 3 angedeutet, ist der Vorbereitung von FSS für enzymatische Verdauungen in der Vergangenheit wenig Interesse gewidmet worden, was zusammen mit der Verwendung unspezifischer Proteasen zur Erzeugung von Peptiden peptidchemische Arbeiten ungemein verzögert hat. Andererseits werden mit der Weiterentwicklung einschlägiger Techniken allmählich günstige Voraussetzungen für die Sequenzanalyse sehr großer Proteine geschaffen. Günstig ist dabei die selektive Spaltung völlig gelöster Proteine an sehr wenigen Spaltstellen, etwa durch Bromcyan in Säure (114) an den Methioninresten oder - nach chemischer Modifizierung (115) der Seitenketten von Lysinresten - durch die Protease Trypsin an den Argininresten, da die Trennung weniger großer Bruchstücke leichter gelingt, als etwa die Reinigung kleiner Peptide aus einem Gemisch sehr vieler Peptide.

Zur selektiven Modifizierung der Seitenketten von Lysinen stehen etliche Acylierungsreagenzien zur Verfügung, günstig für proteinchemische Arbeiten sind Dicarbonsäureanhydride, wie Bernsteinsäureanhydrid, Maleinsäureanhydrid, Mono(=Citraconsäure-) und Dimethylmaleinsäureanhydrid, Phtalsäureanhydrid u.a., denen gemeinsam ist, daß sie im schwach alkalischen Bereich unter Ringöffnung abreagieren und nach Gleichung (6) die positiv geladenen Seitenketten des Lysins in negativ geladene Gruppen überführen.

(6)



Im sauren Bereich wird die gebildete Amidbindung je nach genauer Struktur des Acylierungsreagenzes mehr oder weniger schnell hydrolytisch gespalten. Citraconsäureanhydrid ist als Reagenz für viele Zwecke sehr günstig, da die Citraconyl-Proteinbindung im neutralen und alkalischen Bereich praktisch stabil ist, die Abspaltung des Citraconylrestes jedoch unter nicht zu drastischen, sauren Bedingungen prinzipiell möglich ist (116,117).

Die weiteren Arbeiten dieses Kapitels, die zusammen mit F. Wieland durchgeführt werden, gehen von der Frage aus, ob ein großes Protein wie FSS vollständig und - wichtiger - in homogener Weise chemisch modifiziert, nämlich citraconyliert und carboxymethyliert werden kann.

Interessante Konsequenzen ergeben sich aus dem Ergebnis der zur Einheitlichkeitsprüfung des chemisch modifizierten Proteins durchgeführten Harnstoffgelelektrophorese, wodurch nicht nur eine Lokalisierung der Transferasen, sondern auch die Beschreibung eines hochauflösenden Systems zur Trennung von Protein-untereinheiten möglich wird.

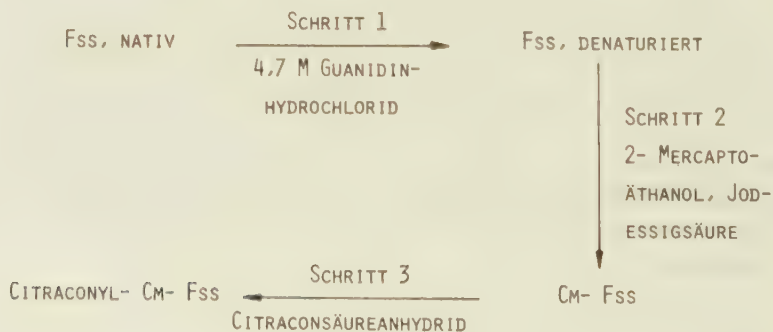


Abb.: 32

FSS wird gemäß dem auf Abb. 32 dargestellten Schema denaturiert (Guanidinhydrochlorid statt wie früher Harnstoff wird lediglich einer späteren Generalisierung des Schemas wegen verwendet) und wie früher carboxymethyliert. Auf die Modifizierung der Thiole in homogener Phase folgt im Eintopfverfahren die Acylierung der freien Lysine mit Citraconsäureanhydrid in einem Puffer hoher Pufferkapazität und unter pH-Kontrolle. Zur Überprüfung des Ausmaßes der chemischen Modifizierung wird ein Aliquot des so gewonnenen Proteins durch Gelchromatographie von Guanidinhydrochlorid (welches die Bestimmung freier NH_2 -Gruppen stört) und Mercaptoäthanol (welches die Bestimmung freier SH-Gruppen stört), sowie allen weiteren Reagenzien befreit. Im Test mit DTNB können keine freien SH-Gruppen nachgewiesen werden, was die vollständige Alkylierung der SH-Gruppen zeigt. Freie NH_2 -Gruppen werden gemäß Gl. 7 mit Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) bestimmt (118).

(7)

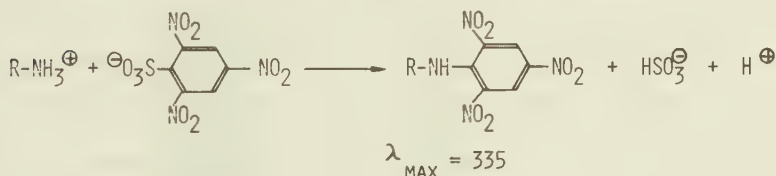


Abb. 33 zeigt eine TNBS-Titration von NH_2 -Gruppen des modifizierten Proteins und zur Kontrolle von nativer FSS: Nach Modifizierung sind keine freien Aminogruppen mehr nachweisbar. Das bedeutet, daß die in den beschriebenen Modifizierungsreaktionen grundsätzlich am reaktivsten Aminosäuren (Cystein und Lysin) auch quantitativ erfaßt werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß weitere Aminosäuren, etwa Histidin und Methionin bei der Carboxymethylierung (119) oder Threonin und Serin bei der Citraconylierung (117) in Seitenreaktionen in heterogener, unreproduzierbarer Weise reagieren. Eine Klärung dazu sollte durch Gelelektrophorese möglich sein.

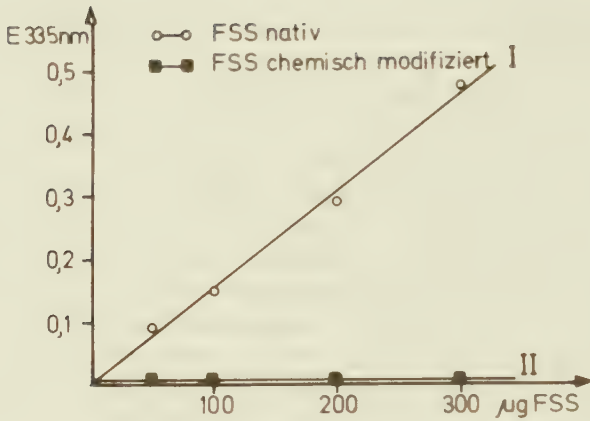


Abb. 33: Bestimmung freier Aminogruppen in nativer (I) und in nach Abb. 32 chemisch modifizierter FSS
Durchführung s. Exp. Teil

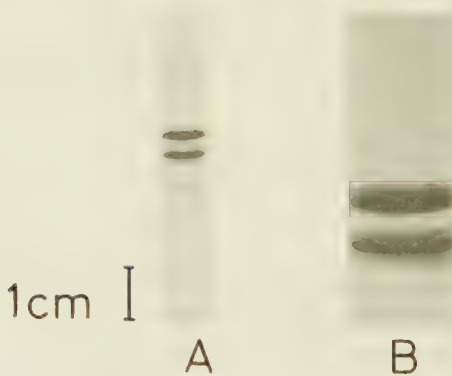


Abb. 34: Gelelektrophorese von chemisch modifizierter FSS
A) Normalgröße B) Gel 2,3-fach vergrößert

Chemische Modifizierung von FSS (6 mg/ml) nach Abb. 32 (s. Exp. Teil)
dialysierte Proben (10 μg/Gel); Gel: 0.4 x 6 cm, 3.4 % Acrylamid, 0.1 % Bis, 0.029 % Temed, 6 M Harnstoff.
Laufzeit 2 h, 4° C. Weitere Einzelheiten s. Exp. Teil.

Wird wie oben modifizierte FSS gegen harnstoffhaltigen Elektrophoresepuffer (s. Exp. Teil) dialysiert und auf homogenen 3.4 %igen oder 5 %igen Polyacrylamidgelen, die 6 M Harnstoff enthalten, der Gelelektrophorese unterworfen, so werden erfreulicherweise zwei scharfe Hauptbanden und eine schwache, etwas schneller wandernde Nebenbande beobachtet (Abb. 34).

Wie in Kapitel 1 beschrieben, ist FSS aus nur zwei Sorten multifunktionaler Proteine α und β aufgebaut (18). Es wird unmittelbar vermutet, daß das beschriebene Bandenmuster auf die elektrophoretische Auftrennung in diese dann im wesentlichen homogen modifizierten Proteine zurückzuführen ist. Unwahrscheinlicher zwar, jedoch nicht ganz auszuschließen ist, daß die zwei Hauptbanden verschiedene Populationen der Gemische von α mit β und α^+ mit β^+ sind, wo etwa α^+ und β^+ durch Nebenreaktionen stärker chemisch modifiziert sind als α und β . Die Klärung dieser Frage ist leicht möglich, da mit Jodacetamid ein nach Arbeiten von Oesterhelt und Kresze hochselektives Reagenz zur Markierung (Carboxamidomethylierung) des aktiven Zentrums des kondensierenden Teilenzym zur Verfügung steht (120), andererseits das kondensierende Enzym nach Arbeiten von Kresze und Schweizer (121) auf der Untereinheit α lokalisiert ist. FSS wird also mit 1- ^{14}C -Iodoacetamid radioaktiv markiert und nach Abtrennung von überschüssigem Reagenz den chemischen Modifizierungsreaktionen und der Gelelektrophorese unterworfen. Nach Anfärben und Entfärben der Gele werden diese in einem Gelscanner bei 550 nm vermessen und dann in gleich dicke Scheiben geschnitten. Die Radioaktivität der Fraktionen wird im Szintillationszähler bestimmt. Die Balken in Abb. 35 oben geben die Radioaktivitätsverteilung an und zeigen, daß der Carboxamidomethylrest ausschließlich in die schneller wandernde Bande eingebaut wird, die langsamer wandernde Bande I enthält überhaupt keine Radioaktivität. Dies bedeutet, daß es sich bei den Banden II und III um α und vermutlich α' (ein von Schweizer beschriebenes, proteolytisches Abbauprodukt von α (18)) handeln muß. Folglich stellt die langsamer wandernde Bande die Untereinheit β dar.

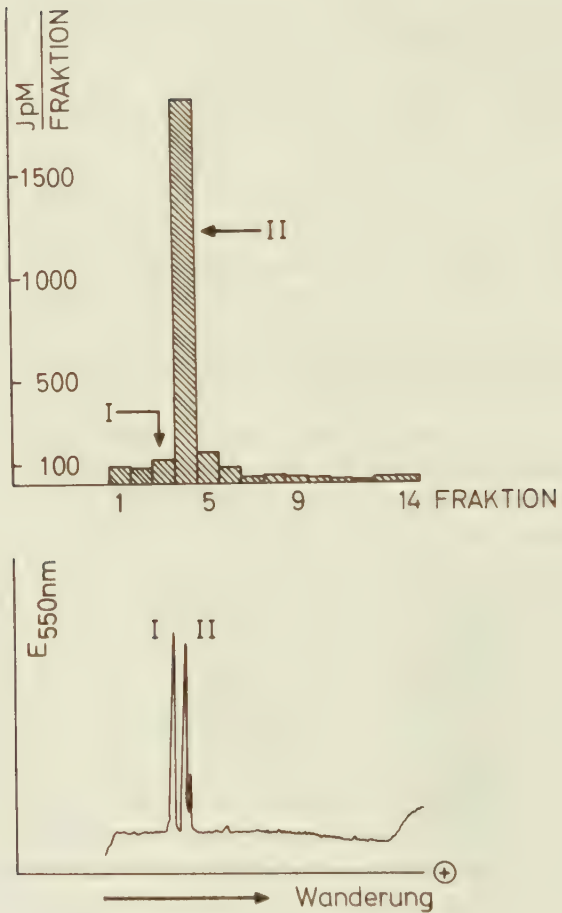


Abb. 35: Gelelektrophorese von α -markierter, chemisch modifizierter FSS

A) Radioaktivitätsverteilung im Gel

B) Densitometrisches Profil des angefärbten Gels.

Carboxamidomethylierung von FSS mit ^{14}C -Iodacetamid nach (61).
s. 7.5.2. Abtrennung von Reagenz durch Sephadex-G 25-Chromatographie. Chemische Modifizierung, Dialyse und Gelelektrophorese s. 7.5.3. und 7.5.4., Radioaktivitätsbestimmung s. 7.1.4.2.

Dies bedeutet:

1. Das beschriebene Verfahren der chemischen Modifizierung unter schonenden Bedingungen führt zu homogen modifizierten, wasserlöslichen Proteinuntereinheiten; die Verwendung dieses Materials in argininspezifischen, tryptischen Spaltungen sollte die Gewinnung großer Peptide für zukünftige, umfassende, sequenzanalytische Studien erleichtern.
2. FSS kann unabhängig von der Gelelektrophorese in Gegenwart des ionischen Detergenz SDS in die Untereinheiten aufgetrennt werden. Die erzielte Auflösung ist der auf SDS-Gradientengelen erreichbaren Trennung vergleichbar, dabei in kürzerer Zeit (1-2 h) und unter Verwendung größerer Proteinmengen möglich (5-40 µg). Dies eröffnet die Möglichkeit, die Bindungsstellen der Transferasen unabhängig von der SDS-Gelelektrophorese auf den Untereinheiten zu lokalisieren.

5.2. Proteinchemische Lokalisierung des Acetyl-, Malonyl- und Palmityltransferase (179)

Das genetische Konzept vom Aufbau von FSS aus multifunktionalen Proteinen ist durch die proteinchemische Lokalisierung von ACP (18) und kondensierendem Enzym(121) auf d Kette α für diese Untereinheit bewiesen. Zur Lokalisierung der Transferasen werden wie in früheren Kapiteln reaktive SH-Gruppen von FSS mit DTNB blockiert, und je ein Ansatz mit 1- ^{14}C -Acetyl-CoA, 3- ^{14}C -Malonyl-CoA und 1- ^{14}C -Palmityl-CoA versetzt.

Beim Abstoppen der Reaktion durch Eingießen in DTNB-haltige Guanidinhydrochloridlösung werden freie SH-Gruppen durch Reaktion mit DTNB blockiert. In Abwandlung des früheren Schemas wird nun zuerst citraconyliert.

Erst dann erfolgt die Reduktion der Disulfidbindungen und die Carboxymethylierung (Schritt 3 in Abb. 32 vor Schritt 2). Nach Dialyse gegen den Elektrophoresepuffer, dem 6 M Harnstoff beigemischt wird, werden die Proben der Gelelektrophorese unter-

worfen, die Proteine durch Anfärbung lokalisiert, die Gele in Scheiben geschnitten und die Radioaktivität der Scheiben bestimmt. Das Ergebnis der Versuche ist in Abb. 36 zusammengefaßt.



Abb. 36: Lokalisierung der Acetyl-, Malonyl- und Palmityl-transferase von FSS auf der Untereinheit β

FSS Vorinkubation: 10^{-3} M DTNB, 2h, 25°C , Inkubation mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetyl-, $3\text{-}^{14}\text{C}$ -Malonyl- oder $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Palmityl-CoA s. 7.5.2. Chemische Modifizierung (spezielles Verfahren, Schritt 3 vor Schritt 2, Abb. 32). s. 7.5.3. Gelelektrophorese und Bestimmung der Radioaktivität in den Gelen 7.5.4. und 7.1.

Die Radioaktivität von Acetat (Abb. 36A), von Malonat (B) und von Palmitat (C) findet sich in der langsamer wandernden Bande I wieder. Alle drei Transferasen des Komplexes liegen also auf der Untereinheit β . (Ein Kontrollversuch von spezifisch in α radioaktiv markierter FSS zeigt, daß das elektrophoretische Verhalten der Polypeptide durch das gegenüber dem Schema (Abb. 32) geänderte Vorgehen nicht beeinflusst wird).

Das Ergebnis dieser Versuche ist in Übereinstimmung mit der Lokalisierung der Malonyl-Palmityl-Transferase, wie sie von Schweizer auf Grund genetischer Untersuchungen vorgeschlagen ist (89) und zeigt außerdem, daß auch die Acylbindungsstelle der Acetyltransferase auf der Untereinheit β lokalisiert ist. Dieses Ergebnis wird durch kürzlich durchgeführte, genetische Untersuchungen gestützt (110) und beweist einen früheren Zuordnungsvorschlag von Hess (88). Die geschilderten Befunde können weiterhin als proteinchemischer Beweis für die Multifunktionalität der Untereinheit β betrachtet werden und werden durch neuere enzymologische Studien von Wieland gestützt (122).

5.3. Allgemeine Anwendung des Verfahrens

Die beschriebene Untereinheitentrennung von FSS wirft die Frage auf, ob die Kombination von chemischer Modifizierung und Harnstoff-Gelelektrophorese nicht eine mehr allgemeine Anwendung in der Analytik von Proteingemischen finden kann. Aus diesem Grund werden verschiedene Proteine mit dieser Methode untersucht. Es handelt sich dabei um folgende:

Als Vertreter großer Polypeptide mit hohen Molekulargewichten werden neben den FSS-Untereinheiten 6-Methylsalicylsäuresynthetase aus *Penicillium patulum* (6-MSS), Acetyl-CoA-Carboxylase aus Hefe und RNS-Polymerase aus *E. coli* und deren isolierte Untereinheiten β , β' und σ untersucht⁺. Abb. 37 zeigt die Auftrennung

+ An dieser Stelle sei den Herren J. Friedrich, Dr. Dr. J. Spieß, Professor Dr. W. Zillig und Dr. P. Palm gedankt, die die genannten Enzyme (Reihenfolge wie oben) freundlicherweise zur Verfügung gestellt haben.

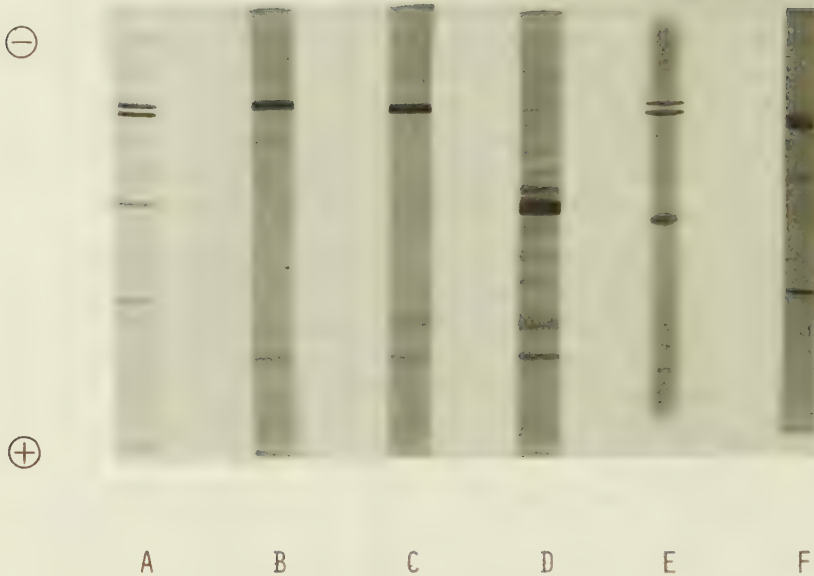


Abb. 37: Auftrennung der Untereinheiten von RNS-Polymerase aus *E. coli*

Chemische Modifizierung (allgemeines Verfahren) von RNS-Polymerase und den Untereinheiten β' , β und σ nach 7.5.1.; Gelelektrophorese mit je 10 μg nach 7.5.4. Acrylamidkonzentration der Gele A-E 3.4 %.

A = Gesamt-Polymerase

B = Untereinheit β'

C = Untereinheit β

D = Untereinheit σ

E = Gemisch der Untereinheiten β' , β und σ

F = Gesamt-Polymerase auf einem SDS-Acrylamid-Gradienten-Gel (5-15 % Acrylamid, System Laemmli (180)), freundlicherweise von Professor Dr. W. Zillig zur Verfügung gestellt.

von RNS-Polymerase (Gel A) sowie das elektrophoretische Verhalten der Untereinheiten β' (Gel B), β (Gel C) und σ (Gel D). Gel E zeigt das Wanderungsverhalten einer Mischung von β' , β und σ . Diese Auftrennung wird verglichen mit dem Muster von Gesamt-Polymerase, wie es von Professor Zillig auf einem SDS-Gradienten-Gel erhalten und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden ist (Gel F).

Aus dem Vergleich geht hervor, daß das relative Wanderungsverhalten der Untereinheiten zueinander in beiden Fällen gleich ist. Die Auftrennung der ähnlich großen Polypeptide β' und β (Molekulargewicht 165 000 und 155 000 (123)) ist im homogenen 3.4 %igen Polyacrylamid-Gel durchaus vergleichbar mit der auf einem SDS-Gradienten-Gel erhaltenen.

Der Komplex Acetyl-CoA-Carboxylase enthält nur einen Untereinheitentyp (124) und zeigt nach Gelelektrophorese mit der beschriebenen Methode im wesentlichen eine Bande, ein Hinweis auf die Homogenität des modifizierten Proteins (Abb. 38A). Von 6-MSS wird angenommen, daß auch hier nur ein Untereinheitentyp den Komplex aufbaut (135); auch in diesem Fall kann nur eine Proteinbande beobachtet werden (Abb. 38B).

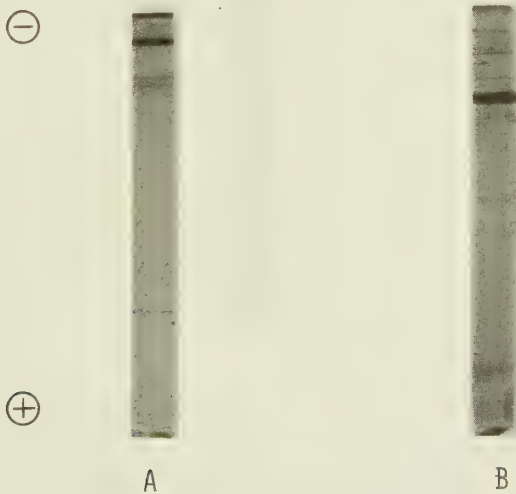


Abb. 38: Gelelektrophorese von Acetyl-CoA-Carboxylase und 6-Methylsalicylsäuresynthetase

Chemische Modifizierung nach 7.5.1., Gelelektrophorese mit je 10 μ g nach 7.5.4., Acrylamidkonzentration der Gele 5 %.

A = Acetyl-CoA-Carboxylase
B = 6-Methylsalicylsäuresynthetase

Um die Anwendbarkeit der Methode auf Proteine mit fibrillärer Struktur zu prüfen, werden Typ-I-Kollagen des Huhns und Typ-III-Kollagen des Kalbs untersucht (Abb. 39)⁺. Wie in Abb. 39A gezeigt, ergibt Typ-I-Kollagen zwei schwach getrennte Banden I und II mit einem ungefähren Anfärbungsverhältnis von 1:2, und eine dritte Zone, die viel langsamer wandert.

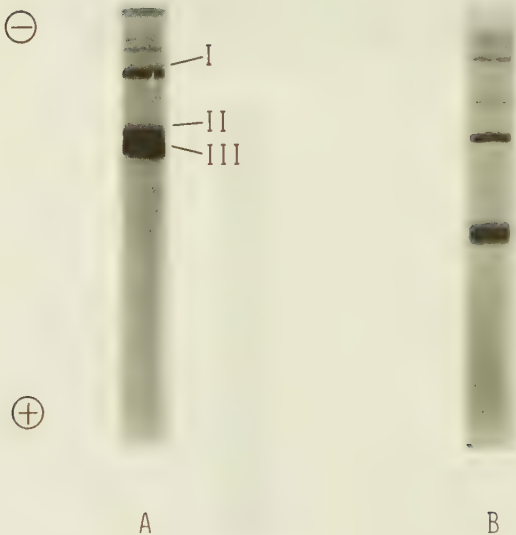


Abb. 39: Auftrennung von verschiedenen Kollagenuntereinheiten

Chemische Modifizierung nach 7.5.1, Harnstoffgelelektrophorese nach 7.5.4. Acrylamidkonzentration der Gele 3.4 %

- A Typ I Kollagen (Huhn)
- B Typ III Kollagen (Kalb)

+ Herrn Dr. P. Müller sind wir für Proben der aufgeführten Kollagene dankbar.

Die Untereinheitenstruktur dieses Kollagens ist $(\alpha 1 I)_2 \alpha 2$ und es enthält kovalent verknüpfte Dimere und Trimere (126,127). Die Intensität der Banden läßt die Annahme zu, daß es sich bei der am schnellsten wandernden um $\alpha 1$ handelt, das knapp von $\alpha 2$ getrennt ist. Das viel langsamer wandernde Material könnte Dimere und Trimere darstellen. Typ-III-Kollagen (Abb. 39B) zeigt in Übereinstimmung mit seiner Untereinheitenstruktur $(\alpha 1 III)_3$ eine starke Hauptbande. Auch hier ist einiges oligomeres Material zu beobachten, das viel langsamer wandert.

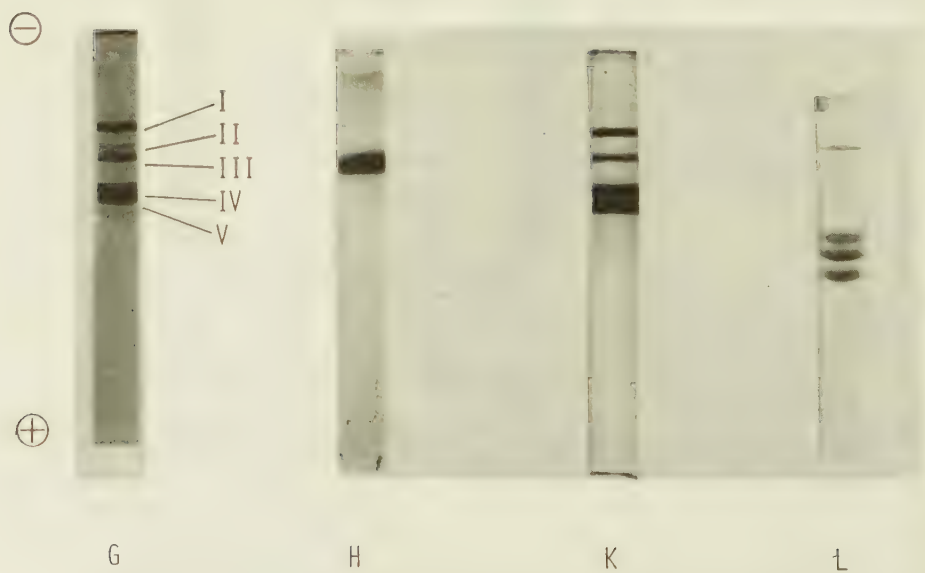
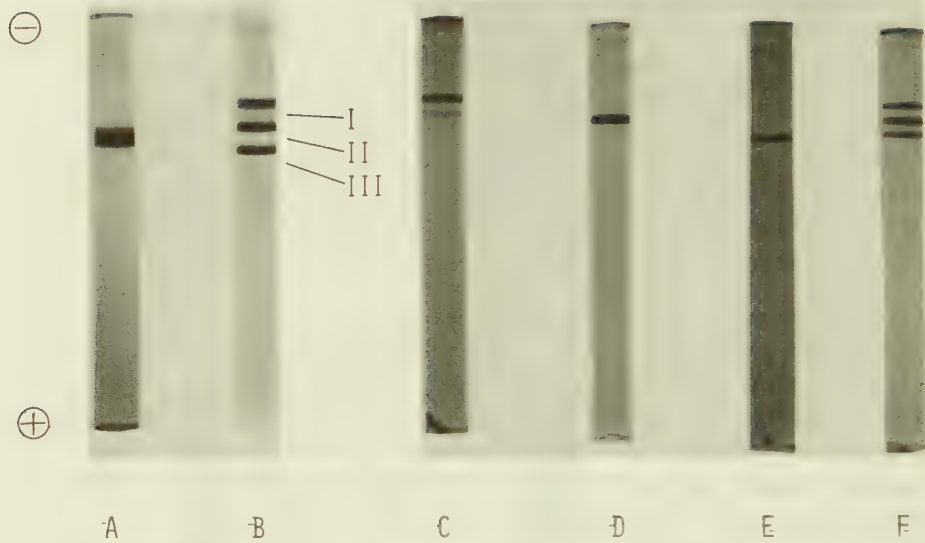
Da viele Komplexe aus Untereinheiten geringeren Molekulargewichts aufgebaut sind als die bisher untersuchten Proteine, wird die Zuverlässigkeit der Methode auch für die Auftrennung kleinerer Proteine geprüft. Abb. 40 zeigt die Trennmuster von Kaninchenmuskelaldolase (40A), menschlichem Fibrinogen und seinen Untereinheiten α , β und γ (B-F), Pyruvatdehydrogenase aus der Rinderniere (G) und Schweinehämoglobin (H)⁺.

Abb. 40: Gelelektrophoresen von menschlichem Fibrinogen,
Kaninchenmuskelaldolase
Pyruvatdehydrogenase aus Rinderniere und Schweinehämoglobin

Chemische Modifizierung nach 7.5.1., Harnstoffgelelektrophorese nach 7.5.4.

A = Kaninchenmuskelaldolase (7.5 % Acrylamid)
B = Menschliches Fibrinogen
C = " " Untereinheit α
D = " " " β
E = " " " γ
F = " " Untereinheiten α , β und γ gemischt.
(7.5 % Acrylamid)
G = Pyruvatdehydrogenase aus Rinderniere (7.5 % Acrylamid)
H = Schweinehämoglobin (10 % " "
K = SDS-Gel der Pyruvatdehydrogenase (10 % Acrylamid, System (181))freundlicherweise von Herrn Dr. G.B. Kresze zur Verfügung gestellt
L = SDS Gel von menschlichem Fibrinogen (7.5 % Acrylamid, (System (181))freundlicherweise von Frau Dr. A. Henschen-Edman zur Verfügung gestellt.

+ Wir danken Frau Dr. A. Henschen-Edman für Proben von Fibrinogen und seiner Untereinheiten, Frau Dr. T. Kleinschmidt für das Hämoglobin und Herrn Dr. G.B. Kresze für eine Probe der Pyruvatdehydrogenase.



ABB, 40:

Aldolase ist ein tetrameres Protein aus vier identischen Untereinheiten und zeigt eine Bande (128). Die Auflösung des Fibrinogens in die drei Hauptbanden I, II und III, die die Untereinheiten α , β und γ darstellen, wird in Übereinstimmung mit der SDS-Gelelektrophorese gefunden (Abb. 40L). Bande I zeigt eine leichte Heterogenität, die möglicherweise auf einen bekannten proteolytischen Abbau der Untereinheit α zurückzuführen ist (129). Vergleicht man das Bandenmuster des Fibrinogens, wie es mit der beschriebenen Methode erhalten wird, mit dem Muster auf einem SDS-Gel, so tritt ein Vorzug der von ionischen Detergentien freien Elektrophorese zu Tage. Die Banden sind schärfer konzentriert als auf SDS-Gelen.

Pyruvatdehydrogenase ergibt ein Untereinheitenmuster ähnlich dem auf SDS-Gelen beobachteten (Abb. 40 K), mit Transacetylase (I), Lipoyldehydrogenase (III) und mit den Untereinheiten α und β (IV und V). Die schwache Bande II könnte Pyruvatdehydrogenase-Kinase darstellen, von der man weiß, daß sie teilweise mit dem Komplex angereichert wird (130). Im Falle des Schweinehämoglobins wird keine Auftrennung in seine beiden Untereinheiten α und β erreicht. Die sehr ähnlichen Molekulargewichte dieser Untereinheiten und die geringen Unterschiede ihres Gehalts an sauren Aminosäuren und an Lysin können dies erklären (84). Damit ist eine Grenze der Methode gezeigt.

5.4. Diskussion

Wie die Ergebnisse dieses Kapitels zeigen, lassen sich auch große Proteine in homogener Weise chemisch modifizieren. Im Falle der FSS müssen auf Grund des bekannten Gehalts (120) an Lysin und Cystein pro Äquivalent FSS etwa 1402 Aminosäuren in einheitlicher Weise erfaßt worden sein, d.h. unter Zugrundelegung einer heute vermuteten Stöchiometrie $\alpha_6\beta_6$ für den Untereinheitenaufbau immer noch etwa 233 Reste in unterschiedlicher Position und chemischer Umgebung in der Primärstruktur. Derart modifiziertes Protein hat eine hohe negative Überschußladung, ist daher wasserlöslich und zeigt gute Wanderungseigenschaften

in homogenen, harnstoffhaltigen Gelen. Die Verwendbarkeit hoher Feldstärken erlaubt unabhängig von der SDS-Gelelektrophorese eine hochauflösende Trennung der Proteinuntereinheiten. Die kurzen Trennzeiten ermöglichen, wie gezeigt, Lokalisierungsstudien unter Verwendung radioaktiver Marker und dies vermutlich selbst in Fällen, wo die Stabilität der Marker-Proteinbindung geringer ist als im Falle der oben aufgezeigten Sauerstoffester und Thioäther. Das Wanderungsverhalten ist von der Größe und - stärker noch - von der Ladung der chemisch modifizierten Proteine geprägt. So kann im Falle der FSS das schnellere Wanderungsverhalten der größeren Untereinheit α nach Angaben von Wieland (122) mit einem gegenüber der Untereinheit β höheren Gehalt an Lysin und sauren Aminosäuren in α korreliert werden. Auf Grund der Anwendung der Kombination von erschöpfender chemischer Modifizierung und Harnstoffgelelektrophorese auf etliche Proteine und der gezeigten Trennergebnisse, wird eine allgemeinere Verwendung des Verfahrens komplementär zur SDS-Gelelektrophorese vorgeschlagen, insbesondere in Fällen, wo vermutet wird, daß Proteine aus Untereinheiten ähnlichen Molekulargewichts aufgebaut sind.

6. Weitere Untersuchungen an FSS

Die in diesem Kapitel geschilderten Versuche fassen weitere Arbeiten an FSS zusammen, die mit der ursprünglichen Fragestellung dieser Dissertation zum Teil nur indirekt zu tun haben. Während einige Arbeiten frühere Ergebnisse abschließen und abrunden, sind weitere Versuche auch zu dem Zweck beschrieben, Anregungen zu weiteren, proteinchemischen Untersuchungen an FSS zu geben.

6.1. Reaktion mit NEM, Beladungshöhe und Inaktivierung

Ausgangspunkt der zu Anfang des Kapitels geschilderten Ergebnisse ist der Wunsch, für die in 6.2. geschilderten Versuche, ein FSS-Derivat zu gewinnen, in dem alle reaktiven SH-Gruppen stabil blockiert sind.

Während die Reaktion von FSS mit JAA durch kinetische und peptidchemische Arbeiten von Hagen, Oesterheldt und Kresze (25, 43, 61) genau beschrieben ist, sind die Angaben zur Reaktion mit NEM etwas spärlicher.

Die Zahl der bei Reaktion von FSS mit 5×10^{-4} M 2.3- ^{14}C -NEM erfaßten Gruppen sowie die Restaktivität in der Gesamtreaktion ist in Abb. 41 dargestellt.

Offenbar bindet FSS sehr schnell mindestens zehn bis zwölf NEM-Moleküle und reagiert dann etwas langsamer mit weiteren Molekülen ab. Die Beladungshöhe ist also vergleichbar wie oder höher als bei der Reaktion von FSS mit DTNB (10) und ist damit sehr viel höher als bei der Reaktion von FSS mit JAA.

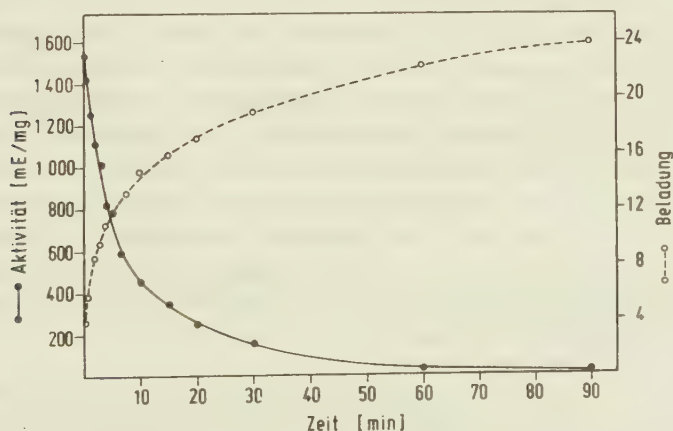


Abb. 41: Messung der Beladungshöhe und der Restaktivität während der Reaktion von FSS mit 2.3- ^{14}C -NEM.

Ausführung exakt nach 7.6.1.

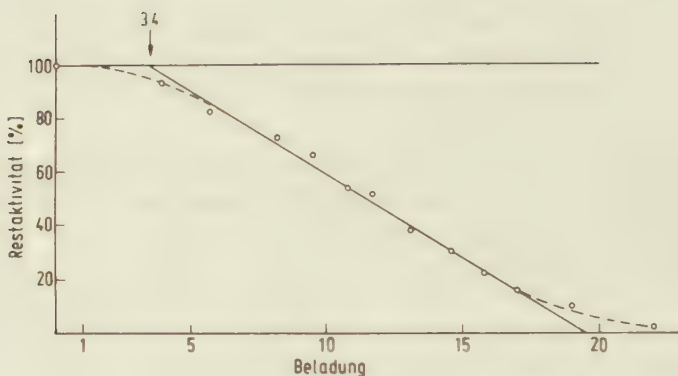


Abb. 42: Die Restaktivität in Abhängigkeit von der NEM-Beladung

Die Restaktivität aus Abb. 41 wird in % umgerechnet und gegen die Beladungshöhe zum betreffenden Zeitpunkt aufgetragen.

Die Gesamtreaktion wird innerhalb von etwa 30 min. praktisch vollständig gehemmt. Wird die Restaktivität gegen die Beladungshöhe zu jedem Zeitpunkt aufgetragen (Abb. 42), so zeigt es sich, daß zu Beginn der Reaktion etwa 3 NEM-Moleküle an FSS binden, ohne daß die Gesamtaktivität geschädigt wird. Erst dann beginnt mit der Aufnahme weiterer NEM-Moleküle die Inaktivierung, die bei Beladung von 14-20 SH-Gruppen 100 % beträgt. Es liegt nahe, daß auch etliche dieser beladenen SH-Gruppen nicht katalytisch aktiv sind, sondern parallel zur Inaktivierung katalytisch aktiver Gruppen abreagieren.

Wird nach 90-minütiger Vorinkubation mit 5×10^{-4} M unmarkiertem NEM, also unter Bedingungen, unter denen reaktive SH-Gruppen bestimmt blockiert sind, mit 10^{-4} M $3\text{-}^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA inkubiert, so wird eine Malonylbeladung in exakt derselben Höhe ermittelt wie in Kapitel 2 nach 120-minütiger Vorinkubation mit 10^{-3} M DTNB.

Der Beladungsendwert wird jedoch langsamer erreicht. Vermutlich ist der Zug, der durch NEM auf das Gleichgewicht der Reaktion (Gl. 8)



durch Abfang von CoASH ausgeübt wird schwächer, da die Ausgangskonzentration an NEM halbsogroß wie früher die Ausgangskonzentration an DTNB ist.

6.2. Barrierenfunktion der Malonyltransferase

Zur Klärung der Frage, ob die Malonyltransferase die Fettsäurebiosynthese im Sinne einer vermuteten, intrazellulären Kompartimentierung gegen das Cytoplasma abschirmt, wird das Gleichgewicht der Reaktion



unter Verwendung eines FSS-Präparats bestimmt, dessen SH-Gruppen durch 90-minütige Reaktion mit 5×10^{-4} M NEM blockiert sind. Dieses wird 15 min bei 4°C mit variablen Mengen ^{14}C -Malonyl-CoA inkubiert. Nach Abstoppen durch TCA und Waschen wird die proteingebundene (als Maß für Malonyl-O-FSS) und die freie Radioaktivität (als Maß für die im Gleichgewicht vorliegende Malonyl-CoA-Konzentration) gemessen. Die Auswertung erfolgt mittels der Beziehungen.

$$\begin{aligned} \frac{[\text{Malonyl-O-Transferase}]}{[\text{Transferase}]} &= \frac{[\text{CoASH}]}{4 \times [\text{FSS}]} \quad \text{und} \\ &= 4 \times [\text{FSS}] \quad \text{nach Gleichung 10} \end{aligned}$$

$$(10) \quad K = \frac{[\text{CoASH}] [\text{Malonyl-O-Transferase}]}{[\text{Malonyl-CoA}] [\text{Transferase}]}$$

Als Ergebnis einer Versuchsreihe (Tab. 18) erhält man eine Gleichgewichtskonstante von $K_{eq} = 0.096$ und daraus $\Delta G_O = -RT \cdot \ln K_{eq} = + 1.27 \frac{\text{kcal}}{\text{Mol}}$, also einen positiven Wert.

TAB.18 WERTETABELLE ZUR GLEICHGEWICHTSMESSUNG DER MALONYL-BELADUNG

KONZENTRATION [μM]				K_{EQ}
MALONYL-O-TRANSFERASE	CoASH	MALONYL-CoA	TRANSFERASE	
6.5	6.5	42.9	11.2	0.087
6.9	6.9	42.7	10.7	0.104
8.5	8.5	91.0	9.2	0.086
9.9	9.9	143.0	7.7	0.089
10.0	10.0	140.9	7.6	0.093
11.6	11.6	191.9	6.0	0.117

MITTELWERT $K_{EQ} = 0.096$

Die Gleichgewichtskonstante ist damit etwas niedriger als die von Oesterheldt für die Reaktion freier PSS mit Malonyl-CoA angegebene Konstante 0.168.

Variiert man nun die Coenzym A-Konzentration, so bleibt die Gleichgewichtskonstante nicht bei obigem Wert, sondern steigt allmählich. Bei genauer Betrachtung der von Oesterheld beschriebenen Tabellenwerte findet man ebenfalls einen Anstieg der individuellen K-Werte mit der Coenzym A-Konzentration (von 0.08 auf 0.23).

Tab. 19: Einfluß der Coenzym A-Konzentration auf die Gleichgewichtskonstante der Malonylbeladung

Mal-O-FSS [μM]	CoA [μM]	Transferase [μM]	Mal-CoA [μM]	K_{eq} (0°C)
12.1	12.1	13.7	135.3	0.078
6.5	58.5	9.3	145.0	0.135
4.5	160.4	21.3	146.2	0.229
4.0	264.1	21.8	147.5	0.328

(Alle Werte sind Mittelwerte zweier unabhängiger Versuche)

Eine Deutung dafür könnte dadurch gegeben werden, daß freies Coenzym A zum Teil fest, jedoch nicht kovalent an FSS bindet, und nicht in der gemessenen Konzentration am Gleichgewicht teilnimmt.

In jedem Fall ist die freie Energie positiv, was zunächst überraschend ist, da Sauerstoffester normalerweise ein niedrigeres Gruppenübertragungspotential als Thioester besitzen und was auf eine spezielle Art der Aktivierung am aktiven Zentrum hindeutet.

Für die Fettsäurebiosynthese läßt sich das derart interpretieren, daß der Transfer von Malonylresten (auf die ja das aktive Zentrum zugeschnitten ist) auf Grund des Verbrauchs dieser Reste in der Kondensation gerade noch möglich ist, jedoch ein Transfer anderer Metaboliten (mit vermutlich höherem ΔG_0) ausgeschlossen wird. Nimmt man darüber hinaus an, daß 4'-Phosphopantethein nur über die Transferasen in Kontakt mit dem Cytoplasma steht, so wird die Rolle der Transferasen als Barriere und Kompartimentierungshilfe augenfällig. Durch einen positiven ΔG_0 -Wert ist sichergestellt, daß die Malonyltransferase nicht zu jedem Zeitpunkt mit Malonylresten besetzt ist (wodurch ein Palmityltransfer ausgeschlossen würde), sondern nur bei hohem Malonyl-CoA-Angebot (was zur Bildung von Fettacyl-CoA-Verbindungen mit längerem Acylrest führt). Ohne die entsprechende Gleichgewichtskonstante für die Reaktion mit Palmityl-CoA gemessen zu haben, wird doch auf Grund des in Kapitel 2.7 Geschilderten vermutet, daß diese Konstante größer sein müßte als die oben für die Malonylbeladung angegebene.

6.3. Reaktion mit gruppenspezifischen Reagenzien

Die Experimente dieses Abschnitts sind im wesentlichen der Frage nach der Architektur des aktiven Zentrums der Malonyl-Palmityl-Transferase gewidmet. Oben war vermutet worden (Kapitel 4.8.), daß die Spezifität der Malonylerkennung durch die positiv geladene Seitenkette einer Aminosäure im aktiven Zentrum sichergestellt werde. Günstige sterische Verhältnisse vorausgesetzt, sollte diese durch spezifische Reaktion mit gruppenspezifischen Reagenzien vielleicht definierbar werden. Auch die Rolle des in den Malonylpeptiden nachgewiesenen Tyrosins wird diskutiert werden.

6.3.1. Reaktion mit Phenylglyoxal

Zur selektiven chemischen Modifizierung von Argininresten eignet sich Phenylglyoxal. Die Reaktion verläuft nach Gleichung 11 (aus 161).

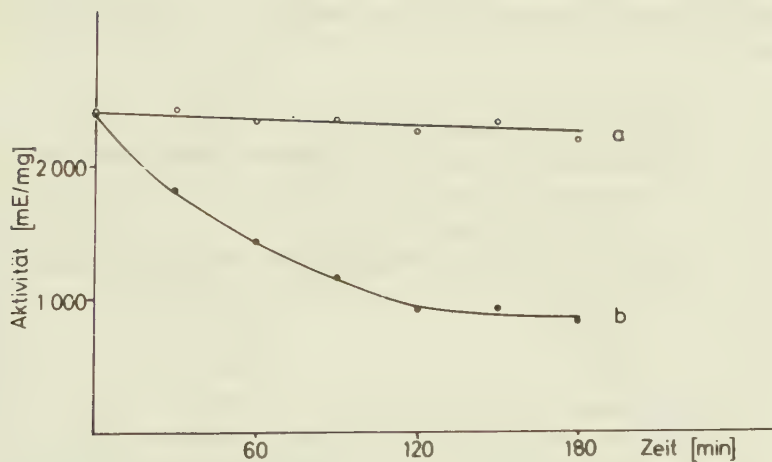
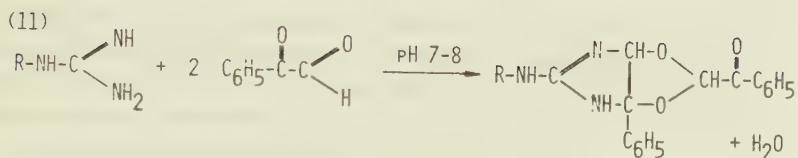


Abb. 43: Messung der Gesamtreaktion von nativer o—o und phenylglyoxalbehandelter FSS ●—●
 FSS wird im in 7.6.3.1. angegebenen Verfahren mit 10^{-3} M Phenylglyoxal behandelt und nach geeigneter Verdünnung bei 60–180 min die Gesamtreaktion gemessen. Kontrolle mit nativer FSS.

Über die hochselektive Anwendung dieses Reagenzes zum Nachweis funktioneller Argininreste in mehreren Enzymen (Glutamatdehydrogenase, 132; Aspartattranscarbamylase, 133,134; aktuelle Übersicht s. 135) wird berichtet.

Wie Abb. 43 zeigt, wird die FSS-Gesamtaktivität durch 1 mM Phenylglyoxal auf etwa 40 % des Ausgangswertes gehemmt. Das Ergebnis von Messungen einiger Teilreaktionen (s. Tab. 20) läßt darauf schließen, daß für die Hemmung der Gesamtreaktion die Hemmung der β -Ketoacylreduktase verantwortlich sein könnte. Die Malonyltransferase wird nur unwesentlich beeinträchtigt. Das läßt sich so deuten, daß ein funktioneller Argininrest an der Erkennung des Malonylrests an der Malonyltransferase entweder nicht beteiligt ist, oder aber so tief verborgen ist, daß er dem Hemmstoff unzugänglich ist. Zur Kontrolle durchgeführte Disk-Elektrophorese des mit Phenylglyoxal modifizierten Enzyms zeigt keine, etwa auf Spaltung zurückzuführende Änderung des elektrophoretischen Verhaltens gegenüber nativer FSS.

Tab. 20: Verhalten von Gesamt- und einigen Teilreaktionen nach chemischer Modifizierung von FSS mit 1 mM Phenylglyoxal ($T = 0^{\circ}C$, $t = 3\text{ h}$)

Reaktion	Restaktivität gegenüber Kontrolle
Gesamtreaktion	40 %
β -Ketoacylreduktase	52 %
Enoylreduktase	94 %
Malonyltransferase	77 %
Acetyltransferase ⁺	110 %

+ Bis etwa 3 Minuten nach Start dieser Modellreaktion wird eine Anlaufkinetik beobachtet; möglicherweise beeinflussen Spuren überschüssigen Hemmstoffs die im Test verwendeten Hilfsenzyme

6.3.2. Einfluß von serinproteasenspezifischen Reagenzien

Auf die Architektur der Serinproteasen Trypsin und Chymotrypsin spezifisch zugeschnitten sind einige Chlormethylketone wie N^{α} -p-Toluolsulfonyl-phenylalanin-chlormethylketon (TPCK, f. Chymotrypsin), N^{α} -Benzyloxycarbonyl-phenylalanin-chlormethyl-

keton (ZPCK, f. Chymotrypsin), N^{α} -p-Toluolsulfonyl-lysin-chlormethylketon (TLCK, f. Trypsin) (136). Die Bindung ans aktive Zentrum erfolgt durch Reaktion mit einem Histidinrest. Wie Tab. 21 zeigt, wird die FSS-Aktivität (Gesamtreaktion durch diese Verbindungen kaum beeinflusst. Wir deuten dies derart, daß keine Teilreaktion, also auch keine Transferase, durch diese Reagenzien beeinflusst wird. Dies bedeutet, daß außer der Primärstruktur auch die dreidimensionale Struktur der aktiven Zentren der Transferasen recht verschieden ist von der dieser Serinprotease.

Tab. 21: Einfluß einiger serinproteasenspezifischer Reagenzien auf FSS

	5×10^{-4} M TPCK		5×10^{-4} M TLCK		5×10^{-4} M ZPCK		Kontrolle	
Inkubationszeit (min)	30	70	30	70	30	70	30	70
spez. Akt. (mE/mg)	1760	1697	1990	1970	1740	1770	1920	1900

6.3.3. Photooxidation

Da die Primärstrukturuntersuchungen der Kapitel 3 und 4 gezeigt haben, daß N-terminal zur Akzeptorgruppe Serin der Malonyl-Palmityl-Transferase Histidin steht, wird untersucht, ob eine Zerstörung von Histidin die Malonyltransferase schädigt. Mit die beste, jedoch eine leider dennoch nicht sehr spezifische Methode zur Modifizierung von Histidin ist die durch Farbstoffe sensibilisierte Photooxidation (137). Als Sensibilisatoren sind u.a. Bengalrosa, Methylenblau, Riboflavin, sowie FMN u.a. beschrieben (137, 138, 139). Vorversuche zeigen, daß FSS auch in Abwesenheit von Bengalrosa, wahrscheinlich sensibilisiert durch FMN, durch Sauerstoff bei Belichten inaktiviert wird. Mit der Gesamtreaktion nimmt die Malonyltransferaseaktivität ab;

wie die Messung einiger Teilreaktionen zeigt (Tab. 22), wird jedoch nicht nur diese, sondern auch die Enoylreduktase, vermutlich durch Zerstörung von FMN, fast völlig gehemmt. Außerdem werden auch die β -Ketoacylreduktase und die Acetyltransferase mehr oder weniger geschädigt.

Tab. 22: Verhalten der Gesamt- und einiger Teilreaktionen nach chemischer Modifizierung von FSS durch Photooxidation

(Teil-)Aktivität	Restaktivität, rel. zur Kontrolle
Gesamtreaktion	7 %
β -Ketoacylreduktase	19 %
Enoylreduktase	10 %
Malonyltransferase	17 %
Acetyltransferase	32 %

Daraus kann man schließen, daß an der Erkennung des Malonylrests oder an der Stabilisierung des aktiven Zentrums der Malonyl-Palmityl-Transferase vielleicht tatsächlich ein Histidinrest maßgeblich beteiligt ist, daß sich dies auf Grund der Unspezifität der Modifizierungsreaktion jedoch so nicht mit letzter Sicherheit beweisen läßt. Ob dieser Rest dann das in der Primärstruktur neben Serin angeordnete Histidin ist, kann ohne weitergehende Untersuchungen natürlich nicht angegeben werden.

6.3.4. Lactoperoxidasereaktion

Da in den im Kapitel 3 sequenzierten Malonylpeptiden Tyrosin enthalten ist, wird untersucht, ob diese Aminosäure am katalytischen Mechanismus direkt beteiligt ist. Zu den selektivsten Methoden der Tyrosinmodifizierung zählt die durch Lactoperoxidase (LPO) katalysierte Iodierung, da diese Reaktion vermutlich (140) ohne die Beteiligung von freiem Jod abläuft. Abb. 44 zeigt die Inaktivierung der Gesamtreaktion bei Zugabe von $2 \times 10^{-4} \text{ M H}_2\text{O}_2$.

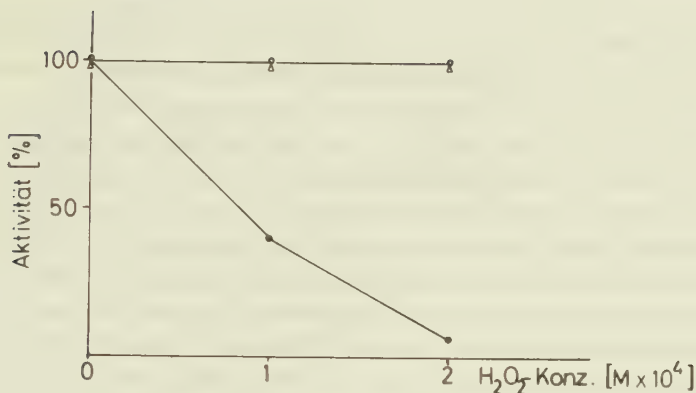


Abb. 44: Messung der Gesamtaktivität ●-●, sowie der Malonyltransferase ○-○ und der β-Ketoacylreduktase Δ-Δ während der Reaktion von FSS mit Lactoperoxidase (LPO).

Chemische Modifizierung von FSS exakt nach 7.6.3.4.

Entnahme von Aliquoten 10 min nach der jeweils letzten H₂O₂ und KJ Zugabe, Verdünnung, Messung der Gesamt- und Teilreaktion.

Die Malonyltransferase und die β-Ketoacylreduktase (s. Abb. 44) werden bei dieser Reaktion genausowenig geschädigt wie die Acyltransferase, Enoylreduktase oder die Dehydratase, d.h. der Verlust der Gesamtreaktion geht vermutlich auf eine streng lactoperoxidaseabhängige (7.6., s. Exp. Teil) Schädigung der Kondensation zurück. Wird noch weiteres H₂O₂ (portionsweise) zugegeben, so nehmen mehrere Aktivitäten - vermutlich unspezifisch - parallel ab, darunter auch die Malonyltransferase. Daraus läßt sich schließen, daß Tyrosin am katalytischen Prozeß der Malonyltransferase nicht direkt beteiligt ist. Ob diese Aminosäure an der Kondensationsreaktion beteiligt ist, läßt sich ohne weitere Experimente (reversible Thiolmodifizierung mit DTNB, Lactoperoxidasereaktion, Reduktion mit Cystein) nicht mit letzter Sicherheit sagen.

6.6. Zusammenfassung

Wie die Untersuchungen dieses Kapitels zeigen, reagiert FSS wesentlich unspezifischer mit NEM als mit JAA unter Inaktivierung. Die selektive Untersuchung der Gleichgewichtslage zwischen Coenzym A- und transferasegebundener Malonsäure zeigt eine Aktivierung des Malonylrests im aktiven Zentrum und unterstreicht die angenommene Barrierenfunktion der Transferase! Wie die weiteren Untersuchungen dieses Kapitels zeigen, kann leider derzeit nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden, inwieweit eine positiv geladene Aminosäure am Erkennungsprozeß des Malonylrests beteiligt ist, das Zusammentreffen der mäßigen Spezifität etlicher Modifizierungsreaktionen mit dem Vorhandensein vieler funktioneller Gruppen an der Oberfläche von FSS erschwert exakte Aussagen in vielen Fällen ungemein. Dies wird durch einige weitere, hier nicht geschilderte Modifizierungsreaktionen mit Maleinsäureanhydrid, Acetanhydrid (für Lysin) (115, 141), Tetranitromethan (142), KJ/J₂ (für Tyrosin (143)) und Woodwards Reagenz K (für Glutamin- und Asparaginsäure (144,145)) unterstrichen. Demgegenüber muß die frühzeitige Entdeckung (25) des hochspezifischen JAA sicherlich als großer Glücksfall bezeichnet werden.

Wie andererseits die Verwendung hochspezifischer Chlormethylketone zeigt, ist die Gestalt des aktiven Zentrums der Malonyl-Palmityl-Transferase offensichtlich von derjenigen der Proteasen Trypsin und Chymotrypsin verschieden. Das verschiedenartige Deacylaseverhalten von Malonyl-Palmityl-Transferase und Acetyltransferase, sowie die früher (43) beobachtete, unterschiedliche Reaktivität gegenüber Diisopropylfluorophosphat zusammen mit den nur geringen Ähnlichkeiten in den Primärstrukturabschnitten läßt vermuten, daß die Architektur der Malonyl-Palmityl-Transferase trotz ähnlicher Funktion auch recht verschieden von der Acetyltransferase ist.

7. EXPERIMENTELLER TEIL

7.1. Allgemeines

7.1.1. Verwendete Geräte

Photometer 'Eppendorf' mit Kompensationsschreiber G 6511,
Netheler und Hinz
Spektralphotometer PM 6 und DMR 21, Zeiß
Spektralphotometer Modell 14, Cary
TriCarb, Liquid Scintillation Spectrometer 3385, Packard
Mark II, Liquid Scintillation System, Nuclear Chicago Division,
Searle
Dünnschichtscanner LB 2722 Berhold und Dual Ratemeterinte-
grator LB 242 K
Präparative Ultrazentrifugen, L 3-50, L 2-65B, L 5-65 mit
Rotoren 21, 30, 60 Ti, Beckmann-Spinco
Tischzentrifuge Labofuge I, Heraeus
" Eppendorf 3200, Netheler und Hinz
Präparative Zentrifugen Sorvall RC-2B; G 50-K, WKF; 8 x 1350
Stock
Fraktionskollektoren Ultrorac, LKB mit UV Monitoren UA5 ISCO
Hochspannungspapiererelektrophoretanks LT 48 A, Savant
Hochspannungsgleichrichter, Hölzel
Aminosäureanalysator LC 6000, Biotronik mit System I, Spectra
Physics
Säulenchromatographiezubehör, Serva
Schlauchpumpen, LKB
Hochdruckflüssigkeitschromatograph (Constametric II, Gradient
Master, Spectromonitor II), Latek
Dünnschichtelektrophoreseapparatur, Eigenbau MPI für Biochemie
Speisegerät Camag
Rotationsverdampfer, Büchi
Ultrafiltrationsgeräte, Millipore, mit Filter, Sartorius
Fluoreszenzspektrometer MPF3, Perkin-Elmer
Zellhomogenisator Manton-Gaulin, Homogenisator SG-Zauberstab
Trockenschrank, Heraeus
Microcaps, Drummond; Kapillarpipetten, Assistant;

Mikroliterspritzen Hamilton
Mikroliterpipetten und Reaktionsgefäße, 'Eppendorf',
Netheler und Hinz
pH-Meter, Metrohm mit Glaselektroden, Ingold
Analysenwaagen, Mettler H54, H 35
Rührmotor Colora
Reaktionsgefäß für Festphasensequenzierung, Eigenbau
MPI für Biochemie

7.1.2. Materialien

Handelsmaterialien: Enzyme und Coenzyme, sofern nicht eigens aufgeführt (Boehringer, Mannheim); TPCK-Trypsin, Pepsin 100 $\frac{\text{mU}}{\text{mg}}$ (Merck, Darmstadt); Thermolysin, 3 x krist., Carboxypeptidase A aus Rinderpankreas, Leucinaminopeptidase aus Rinderaugenlinsen, Palmityl-CoA (sofern nicht selbst hergestellt), TPCK, TLCK, ZPCK, PTH- und DNS-Aminosäuren, das Peptid Gly-Leu-Tyr, Chemikalien für die Polyacrylamidgelelektrophorese (Serva, Heidelberg); Protease V 8 (Miles, Slough); DTNB, NEM, Xylencyanol FF, Orange G, Kristallviolett, Phenylglyoxal, Citraconsäureanhydrid, Norleucin, Norvalin, Guanidin-HCl, Phenylisothiocyanat, Dansylchlorid, Trifluoressigsäure und Benzol (zur Sequenzanalyse), (Fluka, Buchs); 2-Mercaptoäthanol (Roth, Karlsruhe); Serumalbumin vom Rind (Behringwerke, Marburg); Fluram (Hoffmann-LaRoche, Basel); Glucagon vom Schwein (Eli Lilly, Indianapolis); Aminosäurestandard, analysenreine Aminosäuren, Dithiothreitol (Calbiochem, San Diego);

Spherisorb ODS 10 (Latek, Heidelberg); verschiedene Sephadex-typen (Pharmacia, Uppsala); Dowex AG 2 x 10, 200-400 mesh (BioRad, Richmond); DEAE Cellulose DE 52, Papiere 3 MM und 1 (Whatman, Maidstone); Al_2O_3 basisch (ICN-Woelm, Eschwege); Dünnschichtplatten, Kieselgel (Analchem, Luton); Dünnschichtfolien Cel 400 (Machery und Nagel, Düren); Mikropolyamidfolien A 1700 (Schleicher und Schüll, Dassel).

Dialyseschlauch (Union Carbide, Chicago); Stickstoff, nachgereinigt (Linde, München); Varsol (Esso-Münoco, München); Dimilume 30, Soluene 350, PPO, DM-POPOP (Packard, Frankfurt), Unisolve I (Koch-Light, Colnbrook-Buchs); Röntgenfilme x-o-mat

Kodak, Rochester) Entwickler, Roentogen, Fixierer, Superfix (Tetenal, Hamburg).

2.3- ^{14}C -NEM, $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, 1- ^{14}C -Iodacetamid, ^3H - und ^{14}C -Standard-Lösungen (The Radiochemical Centre, Amersham); 1- ^{14}C -Palmityl-CoA, (G)- ^3H -Coenzym A (NEN, Boston).

Alle weiteren Chemikalien, sowie Dünnschichtplatten werden in höchster erhältlicher Reinheit von Merck, Darmstadt, bzw. Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, bezogen.

Freundlicherweise überlassen wurden mir folgende Substanzen: 1- ^{14}C -Acetyl-CoA von Dr. R. Seyffert; eine Probe Carboxypeptidase Y von Dr. H. Lill (Boehringer, Tutzing); Aminopolystyrol von Frau Dr. B. Wittmann-Liebold (MPI f. molekulare Genetik, Berlin); Aminopropylglas von Dr. E. Wachter (Institut f. Physiologie und Physiologische Chemie, Universität München); Acetyl-CoA-Carboxylase aus Hefe von Dr. J. Spieß.

Für die in Kapitel 5 aufgeführten Proteine und deren Untereinheiten bin ich Frau Dr. A. Henschen-Edman und Frau Dr. Kleinschmidt, sowie den Herren Professor Dr. W. Zillig, Dr. P. Palm, Dr. B. Rexer, Dr. P. Müller, J. Friedrich und Dr. G.B. Kresze dankbar.

Bierhefe wurde freundlicherweise von der Löwenbrauerei AG., München, zur Verfügung gestellt.

Nach Literaturvorschriften werden synthetisiert:

Acetyl-CoA (146), Gehaltsbestimmung nach (147); Malonyl-CoA (149), Gehaltsbestimmung nach (150); Palmityl-CoA (151), Gehaltsbestimmung nach (111).

Jodessigsäure wird aus Pentan-Heptan (1:1) zweifach umkristallisiert und bei -15°C im Dunkeln gelagert.

1- ^{14}C -Palmityl-CoA wird nach Bedarf durch unmarkiertes Palmityl-CoA verdünnt. Die radiochemische Reinheit wird dünn-schichtchromatographisch überprüft. System: Kieselgel (HPTLC Platte 10 x 10 cm)-LM B

$$R_f \text{ (vor PAS-Oxidation)} = 0.2$$

$$R_f \text{ (nach PAS-Oxidation)} = 1$$

Reinheit > 95 %.

Gehaltsbestimmung durch Thiolmessung mit DTNB vor und nach alkalischer Verseifung nach (111).

7.1.3. Verzeichnis verwendeter Lösungs- und Laufmittelsysteme

LM	Zusammensetzung
A	1-Butanol/H ₂ O-Oberphase (1% Eisessig)
B	1-Butanol:Phenol:H ₂ O:Eisessig = 2:2:1:1 (v/g/v/v)
C	Pyridin:Eisessig:Aceton:H ₂ O = 1:2:8:40 (v/v)
D	i-Buttersäure:konz. NH ₃ :H ₂ O = 66:1:33 (v/v)
E	1-Butanol:H ₂ O:Eisessig = 4:5:1 (v/v)
F	1-Butanol:Pyridin:Eisessig:H ₂ O = 15:10:3:12 (v/v)
DNS 1	1.5 % Ameisensäure in H ₂ O
DNS 2	Benzol:Eisessig = 9:1 (v/v)
DNS 3	Essigsäureäthylester : Methanol:Eisessig = 20 : 1 : 1 (v/v)
I *	Dichloräthan : Eisessig = 60 : 7 (v/v)
IV *	Heptan : 1-Butanol : 75 % Ameisensäure = 50 : 30:9 (v/v)
V *	Heptan:Propionsäure:Dichloräthan = 58:17:25 (v/v)

* Bezeichnung und Verwendung exakt wie in (61)

7.1.4. Allgemeine analytische Methoden

7.1.4.1. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgt nach der Biuretmethode von Beisenherz (45) in Anlehnung an die Angaben von Oesterheldt (43), oder alternativ nach Warburg und Christian (152). In Sonderfällen (CPY-, Thermolysin-Bestimmung u.ä.) wird Protein durch Messung der UV-Extinktion unter Verwendung der Literaturumrechnungsfaktoren $E_{\lambda}^{1\%}$ (nm) bestimmt (s.u.).

7.1.4.2. Radioaktivitätsmessung

^{14}C - und ^3H -Messungen werden im Szintillationszähler ausgeführt. Zählungen erfolgen in a) homogener oder b) heterogener Phase.

zu a) Die Radioaktivität wässriger Lösungen wird in 10 ml Unisolve I, die von organischen Lösungen in 10 ml Toluolszintillationslösung gemessen. Radioaktive Protein-niederschläge werden mit 1 ml Soluene 350 und 0.1 ml H_2O aufgelöst und in 10 ml Dimilume 30 gezählt.

zu b) Kleine Volumina toluolunlöslicher Proben werden auf Papierstreifen (Whatman 1) aufgetragen, im Luftstrom getrocknet und in Toluolszintillationslösung gemessen. Polyacrylamidgelscheibchen werden mit 1 ml Soluene 350 und 0.1 ml H_2O 2 h bei 40°C inkubiert und nach Zugabe von 10 ml Dimilume 30 gezählt.

Toluolszintillationslösung:

2.5 l Toluol (p.a.) enthalten 12 g PPO und 0.75 g Dimethyl-POPOP. Die Absolutmessung radioaktiver Zerfälle erfolgt nach der Methode des externen Standards (AES channels ratio, (153,154). Eichkurven werden unter Verwendung von radioaktiven Toluolstandardlösungen gewonnen, alle Messungen nur in homogener Phase durchgeführt.

7.1.4.3. Autoradiographie

Das zu untersuchende Trägermaterial (Papier, Dünnschichtplatten) wird mit radioaktiver Tinte (^{14}C -Malonsäure gemischt mit Dextranblaulösung) an mehreren Stellen eindeutig markiert (wichtig für die spätere Lokalisierung!). In völliger Dunkelheit wird ein Röntgenfilm darüber gelegt und mit einer PVC-Platte angepreßt. Belichtungszeit 8-48 h, i.a. jedoch 16 h. Entwicklung und Fixierung erfolgt nach den Vorschriften der Chemikalienhersteller.

7.1.4.4. Isolierung und Aktivitätsbestimmung von FSS

FSS wird aus Bierhefe, die direkt aus dem Brauprozess stammt, gewonnen. Die Suspension wird abzentrifugiert, der Niederschlag in Aufschlußpuffer aufgenommen (pro 4,5 kg Hefe in 6 l Puffer), und die Suspension zur Entfernung grober Partikel, die den Aufschluß stören, durch ein Käsetuch filtriert. Die Anreicherung erfolgt nach (155) mit den von Schreckenbach (15) und Hess (88) angegebenen Veränderungen. Die FSS-Aktivität wird im Standard-Enzymtest bestimmt: Eine Küvette ($d = 1\text{ cm}$) enthält in einem Volumen von 1 ml : 100 μl KPO_4 , pH 6.5, 0.25 mg Serumalbumin, 0.07 μMol Acetyl-CoA, 0.2 μMol NADPH und 3-10 μg FSS. Nach Verfolgung des Blindlaufs über zwei Minuten wird durch Zugabe von 0.1 Mol Malonyl-CoA gestartet. Meßgröße ist die Extinktionsänderung in der Zeiteinheit bei 334 nm ($T = 25^\circ\text{C}$). 1 mE FSS katalysiert den Umsatz von 2 nMol NADPH pro Minute.

7.2. Versuchsbeschreibung zu Kapitel 2

7.2.1. Synthese und Reinigung von 3- ^{14}C -Malonyl-CoA

In einem Volumen von 4 ml H_2O werden vorgelegt:

40 μMol MgCl_2 , 40 μMol MgK_2EDTA , 21 μMol Acetyl-CoA, 62 μMol ATP, 200 μMol Tris-HCl pH 7.5; der pH-Wert wird mit 1 M Tris-Lösung auf 7.5 nachgestellt. 40 μMol KHCO_3 , 34 μMol (2 mCi; 59 mCi/Mol) $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ und ca. 0.8 E Acetyl-CoA-Carboxylase aus Hefe werden zugefügt, das Gefäß dicht verschlossen (Abzug!) und bei 25°C inkubiert; der Verlauf der Reaktion wird durch Be-

stimmung der säurestabilen Radioaktivität verfolgt. Nach 14 h wird angesäuert, 30 min. mit CO_2 -Gas gespült, auf pH 4 eingestellt, durch Sephadex-G 10 - Chromatographie entsalzt und 3- ^{14}C -Malonyl-CoA durch Whatman DE 52-Chromatographie nach (156) gereinigt, an Sephadex G 10 entsalzt und lyophilisiert. Einbau von Radioaktivität (bezogen auf Acetyl-CoA mindestens 30 %).

Reinheitskriterien: Radiodünnschichtchromatographie im System
Cellulose F (0.1 mm, 20 x 20 cm)-LM E, $R_f = 0.15$ -
Hochspannungspapierelektrophorese: Whatman 3 MM, pH 6.5.

Das Präparat wird bei pH 4-5, bei -15°C , gelagert. Nachreinigung durch Ionenaustauschchromatographie ist nach 4-5 Monaten notwendig.

7.2.2. Radioaktive Acylbeladung (Testprinzip 1, (2.1.))

7.2.2.1. DTNB-Behandlung

Von SH-Reagenzien durch Gelfiltration über Sephadex G 25 oder G 50 oder durch Ultrazentrifugation befreite FSS (15-25 mg/ml) wird in 0.1 M KPO_4 , pH 6.5 bei 25°C mit 10^{-3} M DTNB in $V = 200-500\ \mu\text{l}$ inkubiert. Dauer 1-4 h (Abschnitt 2.2), später immer 2 h. Nach Abkühlen auf 0°C erfolgt die Acyl-CoA Inkubation.

7.2.2.2. Inkubation mit 3- ^{14}C -Malonyl-CoA

Zu DTNB-behandelter FSS wird bei 0°C sorgfältig gereinigtes 3- ^{14}C -Malonyl-CoA (spez. Radioaktivität 6470- 17 008 cpm/nMol, Endkonzentration 10^{-4} M) zugegeben und über die angegebenen Zeiten inkubiert (10-120 min.).

7.2.2.3. Inkubation mit 1- ^{14}C -Palmityl-CoA

Zu DTNB-modifizierter FSS wird bei 0°C 1- ^{14}C -Palmityl-CoA (spez. Radioaktivität = 6400- 19 100 cpm/nMol) zugegeben. Entweder wird bei 10^{-4} M über variable Zeiten (15-45 min) oder

30 min mit steigenden Konzentrationen ($0.5-2.5 \times 10^{-4}$ M) inkubiert.

7.2.2.4. Abtrennung von Acyl-CoA durch Waschung

Die Beladung wird durch Zugabe eines mindestens dreifachen Volumens 3 M TCA beendet und der Proteinniederschlag sorgfältig abzentrifugiert. 1 ml 0.3 M TCA wird zugefügt, die Proteinfällung mit einem Glasstab homogenisiert und erneut zentrifugiert. Dies wird noch weitere 4-mal wiederholt, das Protein schließlich mit Soluene 350 in Lösung gebracht und die Radioaktivität der Lösung bestimmt (7.1.4.2.). In Parallelansätzen wird die dieser Radioaktivität entsprechende Proteinmenge bestimmt: Eine gleichgroße Menge Protein wie oben eingesetzt wird ohne DTNB-Behandlung mit TCA gefällt, genau wie oben gewaschen, dann in Biuretreagenz aufgelöst und bestimmt. Die Bestimmung wird immer 2-3-fach gemacht, sorgfältiges (verlustfreies) Waschen vorausgesetzt, ist die Streuung der Meßwerte ≤ 5 %. Die dadurch bedingte Unsicherheit über den exakten Proteinwert ist viel geringer als die Unsicherheit, die sich beim Vergleich von nach der Biuretmethode mit nach der Methode von Warburg und Christian gewonnenen Werten ergibt (Differenz ~ 20 %). Dieses Verfahren wird häufig zur Quantifizierung der Malonylbeladung herangezogen.

7.2.2.5. Abtrennung von Acyl-CoA durch Ionenaustauschchromatographie

Die Beladung wird durch Eingießen eines Volumens Beladungsansatz in zwei Volumina 0.025 M KPO_4 , pH 7.5, 9 M Harnstoff gestoppt. Die Eigenschaften der Lösung (0.05 M KPO_4 , pH 7,6 M Harnstoff) sind dann sehr ähnlich den Eigenschaften der von Lenard in die Abtrennung von SDS eingesetzten Proteinelösungen (49). FSS bindet unter diesen Bedingungen nicht an Dowex AG 2 x 10, äquilibriert mit 0.05 M KPO_4 , pH 7.0, 6 M Harnstoff. Auf mit 1 ml dieses Harzes gefüllte Säulen (Pasteurpipetten) wird 600 μl Lösung mit 4-5 mg FSS aufgesetzt und mit 8 ml 0.05 M KPO_4 , pH 7.0, 6 M Harnstoff eluiert. Die Radioaktivi-

tät eines Aliquots des Eluats wird gemessen.

In Kontrollansätzen wird dieselbe Menge DTNB-inkubierter FSS vor Substratzugabe denaturiert und dann erst Substrat (radioaktives Acyl-CoA) zur selben Endkonzentration zugefügt. Nach Ionenaustauschchromatographie erhält man den (geringen) Anteil der vom basischen Ionenaustauscher nicht gebundenen, neutralen bzw. basischen Verunreinigungen im Acyl-CoA-Präparat.

Zur Proteinbestimmung werden DTNB-freie Ansätze mit FSS denaturiert und exakt wie oben chromatographiert. Protein wird dann nach Warburg und Christian bestimmt (Harnstoff stört in der Biuretmethode). Dieses Verfahren wird zur Quantifizierung der ^{14}C -Palmitylbeladung und in einigen Fällen der ^{14}C -Malonylbeladung herangezogen. Es wird auch prinzipiell in derselben Weise zur Abtrennung von ^{14}C -Palmityl-CoA in den präparativen Ansätzen des 4. Kapitels verwendet.

7.2.3. Spezifität der Beladung

74 mg FSS (spez. Aktivität 2530 mE/mg) wird 2 h bei 25°C mit 10^{-3} M DTNB inkubiert ($V = 3\text{ ml}$, 0.1 M KPO_4 , pH 6.5); nach Abkühlen auf 0° wird für 30 min mit $10^{-4}\text{ M } 3\text{-}^{14}\text{C-Malonyl-CoA}$ (6470 cmp/nMol) versetzt. Reagenzien werden durch Chromatographie an Sephadex G 50 entfernt (Säulenvolumen 55 ml, Elutionspuffer 0.1 M KPO_4 , pH 6.5). Die Beladungszahl des im Ausschlußvolumen eluierten Enzyms beträgt dann 3.5.

Das Enzym wird auf zwei Ansätze verteilt:

1. 17,8 mg FSS, 10^{-3} M CoASH , 0.1 M KPO_4 , pH 6.5, $V = 5,2\text{ ml}$
2. 17,8 mg FSS, 0.1 M KPO_4 , pH 6.5, $V = 5,2\text{ ml}$.

Zu variablen Zeiten werden gleiche Aliquote à 800 μl (2.75 mg) entnommen, in je 2,5 ml 0.3 M TCA pipettiert, abzentrifugiert, noch zweimal mit je 1 ml TCA gewaschen und die proteingebundene Radioaktivität bestimmt.

7.2.4. Der Palmityltransferasetest

(G)- ^3H -Coenzym A wird nach Bedarf mit nach (157) durch Waschen mit 2-Butanon gereinigtem, unmarkiertem CoASH verdünnt. Die Gehaltsbestimmung erfolgt im enzymatischen Test mit Phosphotransacetylase (158). Die radiochemische Reinheit wird überprüft durch Papierchromatographie (System Whatman 3MM - LM D, absteigend, $R_f = 0.5$) (Abb. 45). Die im Test auf ihren Einfluß untersuchten Substanzen müssen frei von Coenzym A sein. Malonyl-CoA wird durch Ionenaustauschchromatographie nach (156) gereinigt, verunreinigendes Coenzym A im Acetyl-CoA-Präparat wird durch Behandlung mit Acetanhydrid blockiert.

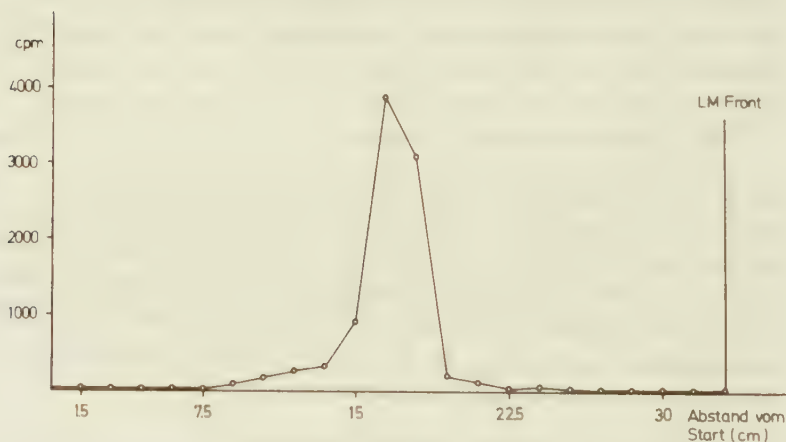


Abb. 45: Papierchromatogramm von ^3H -Coenzym A.

System Whatman 3 MM-LM D, absteigend, Laufzeit 18 h. Das Papier wird nach Trocknung in 1.5 cm breite Streifen geschnitten und die Streifen in Toluol-szintillationslösung gezählt.

Die Zusammenstellung der Inkubationsmischung erfolgt nach (34). In einem Volumen von 980 μ l befinden sich: 100 μ l 1 M KPO_4 , pH 6.5, 0.75 mg Serumalbumin, 12.8 μ Mol Glutathion, 20-30 nMol Palmityl-CoA, 0-90 nMol Malonyl-CoA bzw. 0-1000 nMol Acetyl-CoA, 30 nMol ^3H -CoASH. Der Test wird gestartet durch Zugabe von 0.5 bis 8 μ g FSS in einem Volumen von 20 μ l, die Inkubationszeit bei 25 $^\circ$ C beträgt fünf Minuten. Dann werden 50 μ l 3 M TCA gefolgt von 20 nMol Palmityl-CoA (=Träger) zugefügt, abzentrifugiert, und der Niederschlag mit jeweils 1 ml 0.3 M TCA noch zweimal sorgfältig gewaschen. Dieser Niederschlag (= Palmityl-CoA und Serumalbumin) wird in 0.1 M NaOH aufgelöst und in Unisolve I gezählt.

7.2.5. Acylbeladung von FSS (Testprinzip 2, 2.1.)

Zur Erzielung genauer Meßwerte ist es wichtig, daß die Substratlösungen keine Verunreinigungen mit freien SH-Gruppen enthalten. Acetyl- und Malonyl-CoA werden beide - wie bei Sumper (10) für Malonyl-CoA beschrieben - eine Stunde mit 2×10^{-3} M DTNB bei pH 6.5 inkubiert und durch Gelchromatographie an Sephadex G 10 von entstandenem Thiophenolat und überschüssigem DTNB befreit. Palmityl-CoA wird nicht nachgereinigt, da bei der Darstellung nach Seubert (151) solange Palmitylchlorid zur Coenzym A-Lösung gegeben wird, bis der Nitroprussidtest (159) die Abwesenheit freier SH-Gruppen anzeigt.

Die Vorinkubation von FSS mit DTNB sowie die Ausführung der Experimente erfolgt in enger Anlehnung an die Angaben von Sumper (10). Das Küvettenvolumen wird jedoch auf 1 ml halbiert. Die Proteinkonzentrationen sind höher als bei Sumper, dadurch werden größere Extinktionssprünge aufgezeichnet und die Auswertungen genauer. Die Substrate werden auf kleine Plümperspitzen pipettiert und den Lösungen in den Küvetten ohne Veränderung der Küvettenstellung zugemischt, die Mischzeit kann dadurch minimal gehalten werden (10-30 sec.). Während dieser Zeit auftretende Extinktionsänderungen durch Deacylaseaktivitäten können nicht gemessen werden und werden linear extrapoliert.

7.3. Versuchsbeschreibung zu Kapitel 3

7.3.1. Radioaktive Markierung der Akzeptorgruppe

1000 mg FSS wird bei einer Proteinkonzentration von 20 mg/ml 2 h bei Raumtemperatur mit 10^{-3} M DTNB gerührt. Die Lösung wird auf 0° C abgekühlt und $3\text{-}^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA ad 10^{-4} M zugegeben. Bei 0° C wird unter Rühren 30 min inkubiert. Denaturierung erfolgt durch Eingießen in das doppelte Volumen Denaturierungspuffer, entweder 9 M Harnstoff, 0.1 M Tris-Acetat, pH 7.0 oder häufiger 9 M Harnstoff, 0.75 M Tris-HCl, pH 7.0. Vor weiteren Schritten wird 15 min bei 25° C gerührt, durch Reaktion von freierwerdenden SH-Gruppen mit DTNB tritt eine tiefbernsteinartige Farbe auf.

7.3.2. Reduktion und Carboxymethylierung

7.3.3.

Die Reduktion der SH-Gruppen und die Überführung in stabile, ionische Derivate erfolgt in Anlehnung an Crestfield (162): 150 ml denaturierte Proteinlösung (Endkonzentration an Harnstoff 6 M) wird in einem 500 ml Rundkolben mit Stickstoff gesättigt. 1250 μ l Mercaptoäthanol werden unter Stickstoffschutz zugegeben und Thiolgruppen eine Stunde bei 25° C unter Rühren reduziert. Die Lösung wird dabei rot. Der pH-Wert wird unter kräftigem Rühren mit 1 N NaOH auf 8.5 erhöht und der Rundkolben gegen Lichtzutritt mit Aluminiumfolie abgedeckt. 12.5 ml einer Lösung von Jodessigsäure in 1 N NaOH (0,268 g/ml NaOH) wird unter Rühren und pH-Kontrolle (Glaselektrode) zugegeben und der pH-Wert durch Zugabe von 1 N NaOH während 15 min über 8.0 gehalten. Günstig ist bei diesem Schritt, wenn zur Denaturierung ein Puffer hoher Molarität verwendet worden ist (s.o.). Der pH-Wert wird mit 1 N HCl auf 7.0 zurückgestellt und die Lösung mit flüssigem Stickstoff auf 0° C gekühlt. Überschüssige Reagenzien, insbesondere Iodidionen und überschüssiges $3\text{-}^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA werden dann durch Gelfiltration entfernt.

7.3.4. Abtrennung von Reagenzien

Die carboxymethylierte Proteinlösung ($V = 200$ ml) wird auf eine mit Aluminiumfolie umhüllte Säule des Formats 6.2×35 cm aufgesetzt, die mit Sephadex G 50 medium in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0, 6 M Harnstoff gefüllt ist (Vorbereitung und Packen s. u.). Eluiert wird mit dem genannten Puffer. Fraktionen à 10 ml werden aufgefangen, die Extinktion des Eluats bei 280 nm sowie die Radioaktivitätsverteilung gemessen. Die Spitzenfraktionen radioaktiven Peptidmaterials werden vereint (spezifische Beladung = 4.4) und zur Entfernung von Harnstoff gegen 2×20 l bidest. H_2O 2×4 h dialysiert.

7.3.5. Tryptische Spaltung von ^{14}C -Malonyl-CM-FSS

Harnstoff-freie, carboxymethylierte $3\text{-}^{14}C$ -Malonyl-FSS (8.2×10^6 cpm) wird mit Tris-HCl ad 0.1 M, pH 7.0 ($T = 37^\circ C$) und 10^{-3} M $CaCl_2$ versetzt. Trypsin (TPCK-behandelt, 15 Gew. %) wird in 1 ml 10^{-3} M HCl gelöst und zugefügt. Nach 15 h bei $37^\circ C$ wird mit verdünnter Essigsäure auf pH = 4.6 angesäuert, zentrifugiert, der Rückstand mit 4×5 ml H_2O gewaschen. Der Überstand und die Waschwässer enthalten 5.7×10^6 cpm = 70 % löslicher, radioaktiver Peptide. Er wird bei $40^\circ C$ am Rotationsverdampfer unter Zusatz von etwas n -Octanol auf 10 ml einrotiert; 12 ml 0.1 M Tris-Acetat, pH 4.5 , 6 M Harnstoff wird zugefügt und auf 12 ml einrotiert. Es folgt die Gelchromatographie an Sephadex G 25.

Der Rückstand der tryptischen Spaltung mit ca. 2.5×10^6 cpm radioaktiven Materials wird in $V = 100$ ml 0.1 M Tris-HCl pH 7.0, 10^{-3} M $CaCl_2$ bei $37^\circ C$ resuspendiert. Die ursprüngliche Menge Trypsin wird frisch zugegeben und 10 h inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgt wie bei der Spaltung, weitere $943\ 000$ cpm gehen bei dieser Nachspaltung in Lösung. Der Rückstand wird verworfen.

7.3.6. Gelchromatographie

Die Vorbereitung aller verwendeten Sephadextypen erfolgt nach (163). Die Quellung erfolgt bei Raumtemperatur, Säulen werden unter Verwendung eines Einfülltrichters in einem Guß aus einer entgasten, dicken Suspension (Gesamtvolumen = 1.5-faches abgesetztes Volumen des gequollenen Gels) gepackt. Die für die Fraktionierung von ^{14}C -Malonylpeptiden verwendete Säule (5 x 110 cm) wird vor dem ersten Lauf und nach den einzelnen Läufen tagelang bei konstantem Fluß mit Puffer eluiert, um die Packung zu optimieren und Verunreinigungen zu entfernen. Probenvolumen 1-2 % des Säulenvolumens. Weitere Angaben: siehe Legende zu den Abbildungen.

7.3.7. Ionenaustauschchromatographie an Whatman DE 52

Die Vorbereitung des Austauschers erfolgt nach den Angaben (164) der Hersteller, Äquilibration mit Startpuffer wird durch Vergleich von pH und Leitfähigkeit des Säuleneluats mit den Werten des Startpuffers geprüft.

Säulengröße: I.a. ca. 2 x 18 cm, s. auch Legenden zu Abbildungen.

Probenaufgabe: Eine Entfernung von Salzen und Harnstoff aus den Proben, die bei der Gelchromatographie anfallen, ist überflüssig, da die radioaktiven Peptide unter Startbedingungen an den Austauscher binden. Das Sephadex-G-25-Eluat ($V = 220-270 \text{ ml}$) wird mit bidest. H_2O 1:1 verdünnt und der pH-Wert mit Pyridin auf 6.25 eingestellt. Allgemein muß gelten:

$$\text{pH}_{\text{Probe}} = \text{pH}_{\text{Startpuffer}} + 0.25$$

$$\text{Leitfähigkeit}_{\text{Probe}} \leq \text{Leitfähigkeit}_{\text{Startpuffer}}$$

Nach Aufpumpen der Probe erfolgt die Elution mit Startpuffer, dann mit pH- und Ionenstärkegradienten. Zur Herstellung linearer Gradienten werden zwei gleichgroße, oben offene, zylindrische Mischgefäße verwendet, die mit gleichen Volumina Start- und Endpuffer gefüllt werden.

7.3.8. Hochspannungspapierelektrophorese

Die Hochspannungselektrophorese nach Michl wird gemäß den Angaben der Tankhersteller durchgeführt (56). Die Tanks enthalten durch ein Faltenfilter filtrierte Varsol als Kühlmittel und folgende Puffersysteme:

pH 6.5 : Pyridin:Eisessig:H₂O = 25 : 1 : 349

pH 3.5 : Pyridin:Eisessig:H₂O = 3,3 : 33 : 1463

Als sichtbare Farbmarker werden verwendet:

Je 10 µl Kristallviolett (0.25 %), Xylencyanol FF (0.5 %), Orange G (0.5 %).

Außerdem werden z.T. verwendet

bei pH 6.5: Ala, Asp (je 50 nMol);

bei pH 3.5: Tau, Asp (je 50 nMol).

Proben werden punkt- oder strichförmig auf das Papier (Whatman 3 MM, 28 x 110 cm) mit einer 5 µl Kapillarpipette aufgetragen und im N₂-Strom getrocknet. Auftragsstelle: In der Mitte des Papiers (pH 3.5) oder asymmetrisch, 30 cm vom Papierrand entfernt (pH 6.5). Das Papier wird in den Kunststoffrahmen eingespannt und mit Elektrodenpuffer besprüht. Eine schmale Zone um die Probenauftragsstelle wird freigelassen, durch Diffusion des Puffers in diese Zone wird die Auftragsstelle noch konzentrierter.

Elektrophorese: Je nach Wanderungsverhalten der Peptide im Vergleich zu den Markern 1-3 h bei 5000 V. Trocknung des Papiers: über Nacht bei Raumtemperatur.

Lokalisierung der Peptide: In späteren Versuchen ausschließlich durch Autoradiographie, in Vorversuchen und zur Lokalisierung von Verunreinigungen mit Fluram- oder o-Phtalaldehyd-reagenz.

Verdünntes Fluramreagenz (72): 1 mg Fluram, 90 ml Aceton,
1 ml Pyridin, Sprüh- oder Tauchverfahren. Gelbe Fluoreszenz.

o-Phtalaldehydreagenz (57): 1.5 ml o-Phtalaldehydlösung (10 mg/ml Äthanol) wird mit 90 ml 0.05 M Natriumboratpuffer pH 9.5 gemischt. 1.5 ml einer Lösung von 2-Mercaptoäthanol (5 µl/ml Äthanol) wird zugefügt; Sprüh- oder Tauchverfahren. Bläuliche Fluoreszenz.

Das Papier und alle damit in Berührung kommenden Gegenstände werden nur mit Handschuhen angefaßt.

7.3.9. HCl-Hydrolyse (165)

1-5 nMol Peptid wird in einem Duranglas mit Verjüngung i.V. getrocknet. 1 ml konstant siedende HCl (konz. HCl und bidest. H₂O 1:1 über SnCl₂ destilliert) mit 0.1 % Mercaptoäthanol (166) und 0.1 % Phenol (166) wird zugefügt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Unter Schütteln wird am Vakuum einer Ölpumpe langsam aufgetaut und erneut eingefroren. Während des zweiten Auftauens wird i.V. abgeschmolzen. Die Hydrolyse erfolgt bei 106° C, 20 oder 24 h (für die Ermittlung genauester Zusammensetzungswerte werden gleiche Mengen Peptid 24-28-72 h lang hydrolysiert). Nach Abkühlen wird das Glas geöffnet, der Inhalt sofort bei 35-40° C am Rotationsverdampfer über KOH getrocknet, einmal mit 5-10 ml H₂O aufgenommen und erneut getrocknet. Das Aminosäuregemisch wird in einem definierten Volumen Probenverdünnungspuffer (Lithium- oder Natriumform, je nach Programm des Ammoniumsäureanalysators) aufgenommen und bis zur Analyse bei -15° C gelagert.

7.3.10. Aminosäureanalyse

Zur Aminosäureanalyse steht ein automatischer Analysator (Biotronik) mit elektronischem Rechner (AutoLab System I) zur Verfügung. Verwendet wird ein Natriumcitratpuffersystem (168) oder ein (verkürztes) Lithium-citratpuffersystem (168), das die Trennung von Gln und Asn von Ser erlaubt; Harze: Durrum DC 6A mit Säule 0.6 x 42 cm (Na) oder Durrum DC 4 A mit Säule 0.6 x 20 cm (Li).

Alle für peptidchemische Arbeiten verwendeten Glasgeräte werden nach (15) intensiv gereinigt. Bei Praktisch allen Arbeiten wird zur Vermeidung von Kontaminationen mit Handschuhen gearbeitet.

Perameisensäureoxidation

Die Herstellung von Perameisensäure erfolgt nach (169). Die Reaktion wird, wie bei (15) beschrieben, durchgeführt.

7.3.11. Endgruppenanalyse

Die Endgruppenanalyse der ^{14}C -Malonylpeptide und des ^{14}C -Palmitylheptaepetides wird nach der mehrfach beschriebenen Standardvorschrift (63,64) mit 0.5 - 2 nMol Peptid exakt nach (170) durchgeführt. Folgende Veränderungen werden angebracht: Zur Erleichterung des Abschmelzens beträgt das Format der verwendeten, dickwandigen Gläser 5 x 100 mm. Reagenzien werden mit 12.7 cm langen 25 μl -Kapillarpipetten direkt in den untersten Teil des Glases pipettiert. Die Hydrolyse in 50 μl 6 N HCl bei 106 $^{\circ}$ C dauert 4-22 h. Nach Öffnen der Röhrchen und Trocknung i.V. wird der Rückstand in 10 μl Pyridin-Wasser Gemisch (1:1) gelöst, zentrifugiert und 100-500 nanoLiter des Überstands für die Dünnschichtchromatographie verwendet.

Da die ^{14}C -Malonylpeptide Tyrosin enthalten, wird gelegentlich unter den (basischeren) Reaktionsbedingungen von Tamura (65) gearbeitet, um die vollständige Dansylierung der Hydroxylgruppe des Tyrosins zu erreichen: 1-2 nMol Peptid wird bei 0 $^{\circ}$ C in 10 μl 0.1 M Triäthylamin gelöst und 10 μl Dansylchloridlösung (5 mg/ml Aceton) wird zugefügt. Die Mischung bleibt über Nacht bei 0 $^{\circ}$ C.

Nach Trocknung wird wie oben hydrolysiert.

Eine Standardmischung aller Dansylaminosäuren wird nach Weiner (83) hergestellt, für Cochromatographie mit dem Peptid-dansylierungsansatz wird eine Mischung von DNS-Ile, -Phe, -Gly, -Glu, -Pro, -Ser verwendet.

Die Dünnschichtchromatographie erfolgt auf doppelseitig mit Micropolyamid beschichteten Aluminiumfolien des Formats 3x3 cm

in Solvens I, II, III (62) in kleinen Bechergläsern; zur Feststellung, ob überhaupt Fluoreszenz auftritt, wird ein Vorversuch mit 500 nanoLiter Probenvolumen durchgeführt; günstig ist der Tyrosingehalt vieler Peptide, da der tiefgelbe Fleck von O-DNS-Tyr als interner Marker den positiven Verlauf der Dansylierungsreaktion und die Verwendung ausreichender Mengen für die Chromatographie anzeigt. Die exakte Zuordnung erfolgt zur Erzielung größtmöglicher Auflösung unter Verwendung von etwa 100-200 nanoLiter Probe.

7.3.12. Verdauung mit Leucinaminopeptidase (171)

5 nMol Peptid IIa wird in einem Volumen von 100 μ l 0.2 M Tris-HCl, pH 8.6, 2 mM MgCl₂ mit 32 μ g Leucinaminopeptidase (LAP) aus Rinderaugenlinsen versetzt. Diese Menge Enzym hat nach Herstellerangaben gegenüber Leucinamid eine Aktivität von 12.8 E.

In Parallelansätzen wird

1. die entsprechende Menge Glucagon mit derselben Menge LAP versetzt,
2. Glucagon nur mit Puffer versetzt,
3. Puffer mit der obigen Menge LAP versetzt.

Die Reaktion wird nach 150-minütiger Inkubation bei 37° C durch Zugabe von 10 μ l Eisessig und Abkühlen auf 0° C gestoppt. Nach Zentrifugation wird zum Überstand 390 μ l Lithium-Probenverdünnungspuffer hinzugefügt und jede Probe der automatischen Aminosäureanalyse unterworfen.

Aus Peptid IIa werden keine Aminosäuren freigesetzt, ebenso werden aus LAP ohne Substrat oder aus Glucagon ohne LAP keine Aminosäuren freigesetzt. Aus Glucagon werden - wie die qualitative Auswertung zeigt - größere Mengen fast aller in diesem Peptid vorhandenen (84) Aminosäuren durch LAP freigesetzt, d.h. ein weit über die Freisetzung der N-terminalen Aminosäure hinausgehender Abbau hat stattgefunden.

7.3.13. Sequenzanalyse mit Carboxypeptidase Y

Lyophilisierte Exopeptidase wird in 1.6 ml 0.1 M Pyridin-Acetat-Puffer, pH 5.5, gelöst und 2 h gegen 2 x 1 l bidest. H₂O dialysiert. Bis zur Benutzung wird diese Enzymlösung ($0.56 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$) ($E_{280}^{1\%} = 15$ (70)) in kleinen Portionen eingefroren aufbewahrt.

Die Peptidprobe (15-27 nMol) wird in einem Reaktionsgefäß "Eppendorf" sorgfältig getrocknet und mit 200-240 µl 0.1 N Pyridin-Acetat, pH 5.5, gelöst. 10 µl Norvalin (25 nMol) wird als interner Standard zugegeben und durch Messung der Radioaktivität eines Aliquots die Peptidkonzentration exakt bestimmt. Die Reaktion wird durch Zugabe von CPY (in 10-40 µl) gestartet; das molare Enzym: Substratverhältnis beträgt in einem Vorversuch 1:1600 wird später jedoch mindestens zehnmal höher gewählt (s. Legende zu Abbildungen), die Temperatur ist 37°C. Nach variablen Zeiten (15-180 min) werden gleiche Aliquote à 40 µl entnommen, in einem Siedewasserbad 3-5 min auf 100°C erhitzt und sofort eingefroren. Nach Trocknung im Vakuum wird jede Probe mit 500 µl Lithiumprobenverdünnungspuffer versetzt, zentrifugiert und der Überstand der automatischen Aminosäureanalyse unterworfen.

In Kontrollansätzen wird

1. eine entsprechende Menge Peptid, jedoch ohne Exopeptidase, genauso behandelt
2. eine entsprechende Menge Exopeptidase ohne Peptid inkubiert und analysiert.

Die Kontrollen zeigen, daß die Peptide nicht durch freie Aminosäuren verunreinigt sind, daß CPY in allen verwendeten Konzentrationen frei von Aminosäuren ist und daß sie keine Aminosäuren aus sich freisetzt.

In einigen Experimenten wird das Eluat des Aminosäureanalysetors direkt nach der Durchflußküvette mit einem Fraktionssammler aufgefangen und die Radioaktivität der Fraktionen in Abhängigkeit von der Elutionszeit bestimmt.

Die Normalisierung bei der Analysenauswertung bezüglich Verlusten bei der Aufarbeitung oder der Probeninjektion geschieht anhand des Norvalingipfels. Anhand der vollständigen Freisetzung einzelner Aminosäuren (z.B. Tyr) läßt sich zeigen, daß deren Absolutmenge (bestimmt durch Aminosäureanalyse) mit der Absolutmenge von ^{14}C -Malonsäure (bestimmt durch Radioaktivitätsmessung) im Rahmen der Fehlergrenze übereinstimmt ($\pm 5\%$).

7.3.14. Thermolysinfragmentierung des Peptids IIa

Dreifach kristallisiertes Thermolysin wird in Anlehnung an (71) durch Zugabe von Alkali und rasche Rücktitration in Lösung gebracht: 2.75 mg Thermolysin wird bei 0°C in 1 ml 0.01 N N-Äthylmorpholin-Acetat, pH 7.5, 1 mM CaCl_2 , suspendiert. Durch Zugabe von 2 x 50 μl 0.2 N NaOH wird das Enzym gelöst, die Lösung wird sofort mit 2 x 50 μl 0.2 N Essigsäure auf einen pH-Wert um 7.5 zurücktitriert. Die Enzymkonzentration wird durch Zugabe von Puffer auf 1.4 mg/ml = 38 nMol/ml eingestellt ($E_{277}^{1\%} = 18.3$), die Lösung bis zur Benutzung eingefroren gelagert.

40 nMol Pentapeptid wird in 380 μl 0.2 N N-Äthylmorpholin-Acetat, pH 7.5, gelöst, 20 μl Thermolysinelösung wird zugegeben (molares Enzym: Substratverhältnis 1:52) und 2 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 40 μl Eisessig, Zentrifugation und Einfrieren beendet, nach Lyophilisation wird der Rückstand mit LM F für die Dünnschichtchromatographie aufgenommen.

7.3.15. Dünnschichtchromatographie

Für die Chromatographie von Peptiden werden die von Schreckenbach verwendeten Dünnschichtplatten (0.25 mm Kieselgel auf Glas, Analchem) verwendet. Proben werden punkt- oder strichförmig 2 cm vom Rand entfernt aufgetragen. Peptide der Thermolysinfragmentierung werden mit LM F aufgetrennt. Äquilibration der Tanks 1 h, Laufzeiten 3-5 h.

Das in Kapitel 4 als Nebenkomponte isolierte Palmitylpeptid wird in LM B gereinigt. Laufzeit 4.5 h

Lokalisierung: Durch Autoradiographie bzw. Besprühen mit verdünntem Fluramreagenz. Die peptidhaltigen Kieselgelregionen werden mit einem Spatel ausgekratzt und mit 0.1 M Pyridin-Acetat, pH 6.0 (thermolytische Peptide) bzw. LM A (Palmitylpeptid) eluiert.

7.3.16. Protease-V-8-Fragmentierung

In zwei Ansätzen wird je 60 nMol Peptid I im Eppendorf-Cup in 150 µl 0.05 M Ammoniumacetatpuffer pH 4.0 gelöst und mit 3 nMol Protease-V-8 (E^M_1 cm, 280 nm = 11 500, (172)) versetzt. Die Fragmentierung bei 37°C dauert 20 h und wird durch Zugabe von 20 µl Eisessig, Kühlung auf 0°C und Zentrifugation beendet. Nach Trocknung des Überstands i.V. wird das Peptidmaterial in LM C für die Dünnschichtelektrophorese aufgenommen.

7.3.17. Dünnschichtelektrophorese

Die dünnschichtelektrophoretische Auftrennung der durch Protease-V-8-Spaltung gewonnenen Fragmente erfolgt auf Cel 400 Platten der Firma Machery und Nagel (0.1 mm mikrokristalline Cellulose auf Kunststoff, 20 x 20 cm) in Anlehnung an die Angaben zur fingerprint-Technik von Heiland (78). Die Probe wird strichförmig in der Mitte aufgetragen, beidseitig werden Farbmarker angebracht, dann wird mit Dünnschichtelektrophoresepuffer LM C im unter 'Hochspannungspapierelektrophorese' angegebenen Verfahren besprüht. Vor Start der Elektrophorese wird in der Elektrophoreseapparatur 30 min mit Pufferdämpfen äquilibriert.

Elektrophoreseapparatur: Gekühlte Platte, 2 Pufferreservoir, Plastikhaube (Eigenbau MPI für Biochemie); Strombrücken: Mit Puffer voreluierte Streifen von Whatman 1.

Elektrophoresebedingungen: 2 h 20 min. 400 V, 18 mA.

7.3.18. Edman-Abbau der Peptide IIa Th III und I-V-8-I

Zum Edmanabbau der Fragmente wird das von Schreckenbach (15) angegebene Verfahren verwendet, das eine Kombination der in (67), (72) und (74) beschriebenen Arbeitsweisen ist. Reaktionsgefäß: Rundes Schliffzentrifugenglas 10 x 80 mm.

Die Umlagerung der Thiazolinone zu den PTH-Aminosäuren erfolgt nach Edman (67) in 0.2 ml 1 N HCl, 10 min bei 80° C. Die wässrige Phase wird abgekühlt, mit 3 x 300 µl Essigsäureäthylester extrahiert, der Essigester wird mit Stickstoff verblasen, die PTH-Aminosäuren in Dichloräthan gelöst.

Bei der Sequenzierung von I-V-8-I wird succinyliertes Rinderserumalbumin als Träger verwendet.

Succinylierung von Rinderserumalbumin (in Anlehnung an (173)): 100 mg Rinderserumalbumin wird in 10 ml bidest. H₂O gelöst, 164 mg NaHCO₃ und 3.6 g Harnstoff wird zugefügt. Im Lauf von 1 h wird 4 x 120 mg Bernsteinsäureanhydrid bei 25° C unter starkem, magnetischem Rühren zugegeben und der pH-Wert mit 1 N NaOH zwischen 7.5 und 8.5 gehalten. Die Lösung wird gegen 5 l 0.1 N NaHCO₃ und 2 x 5 l bidest. H₂O über Nacht dialysiert. 50 µl der Lösung (0.2 mg) erlauben die problemlose Sequenzierung des (hydrophoben) Modellpeptids Gly-Leu-Tyr (50 nMol) und dieselbe Menge wird bei der Sequenzierung des V-8-Fragments verwendet.

7.3.19. Identifizierung von PTH-Aminosäuren

Zur Identifizierung werden HPTLC (= High Performance Thin Layer Chromatography) Platten (Kieselgel mit Fluoreszenzindikator) der Firma Merck verwendet. Die verwendeten Laufmittel (LM I, IV, V, 7.1.3.) und die Markermischungen sind erst kürzlich von Kresze (61) beschrieben. Laufzeit 30 min. Nachweis durch Fluoreszenzlöschung oder mit Calcein-PdCl₂-Sprühreagenz (174,175).

Maximale Empfindlichkeit: ca. 0.1 nMol.

7.3.20. Reduktive Hydrolyse (76)

Identische Aliquote der in jedem Zyklus anfallenden PTH-Aminosäuren werden mit 300 µl HJ versetzt. Nach Entlüftung wird evakuiert und zugeschmolzen (s.a. HCl-Hydrolyse). Hydrolysezeit (130°C), 20 h. Nach dieser Zeit werden die Proben bei 40°C am Vakuum einer Ölpumpe getrocknet und für die anschließende Aminosäureanalyse in Lithiumprobenverdünnungspuffer aufgenommen.

7.4. Versuchsbeschreibung zu Kapitel 4

7.4.1. Radioaktive Markierung der Akzeptorgruppe

770 mg FSS wird mit 10^{-3} M DTNB 2 h gerührt ($V = 38\text{ ml}$, 25°C), dann wird auf 0°C gekühlt. $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Palmityl-CoA (spez. Radioaktivität 6400-19500 cpm/nMol) wird zu einer Endkonzentration von $5\text{-}7.5 \times 10^{-5}\text{ M}$ zugefügt und 15 min bei 0°C inkubiert. Die Markierung der Akzeptorgruppe wird durch Eingießen in das doppelte Volumen 0.025 M KPO_4 , pH 7.5, 9 M Harnstoff gestoppt (s. auch 7.2.2.5.). Das Format der zur Abtrennung überschüssigen Palmityl-CoAs verwendeten Säule mit Dowex AG 2 x 10 beträgt $2.5 \times 20\text{ cm}$, Elutionspuffer s. 7.2.2.5.

Radioaktives Protein enthaltende Eluatfraktionen werden vereint ($V = 127\text{ ml}$) und zur Erhöhung der Pufferkapazität bei 0°C gegen $2 \times 5\text{ l } 0.5\text{ M Tris-HCl}$, pH 7.0, 6 M Harnstoff, 3 h dialysiert.

7.4.2. Reduktion und Carboxymethylierung

Diese Schritte erfolgen praktisch wie früher beschrieben (7.3.2.). Für $V = 110\text{ ml}$ Proteinlösung werden 916 µl Mercaptoäthanol zur Reduktion (1 h), dann 9.16 ml einer Lösung von Jodessigsäure in 1 N NaOH (0.268 g/ml) zur Carboxymethylierung verwendet. Zur Entfernung von Reagenzien und Harnstoff wird gegen $3 \times 20\text{ l}$ bidest. H_2O insgesamt 8 h dialysiert ($T = 0^{\circ}\text{C}$).

7.4.3. Tryptische Spaltungen

Die Palmityl- CM-FSS-Lösung wird mit Tris-HCl pH 7.0 ad 0.1 M, sowie 10^{-3} M CaCl_2 versetzt. 15 Gew. % Trypsin (bezogen auf 770 mg FSS) wird zugefügt und 15 h bei 37°C inkubiert (Magnetrührer). Der pH-Wert wird dann mit 5 %iger Essigsäure auf pH 5.0 gebracht und die Suspension zentrifugiert (40 min, 20 000 g). Der praktisch nicht radioaktive Überstand mit 515 mg Protein wird verworfen, der Niederschlag mit 6 ml H_2O gewaschen und erneut zentrifugiert. Auch das Waschwasser wird nach Bestimmung von Protein- und Radioaktivitätsmenge verworfen.

Der über NaOH i.V. getrocknete Rückstand wird mit 2×8 ml LM A zweimal extrahiert, auch diese Extrakte werden nach Messung von Protein- und Radioaktivitätsmenge verworfen. Der verbliebene Rückstand wird mit 100 ml 0.1 M Tris-HCl pH 7.0 (37°C), 10^{-3} M CaCl_2 versetzt und mit der ursprünglichen Menge Trypsin erneut 15 h gespalten. Die Reaktion wird wie oben beendet, Zentrifugation und Waschung des Rückstands mit H_2O und LM A erfolgt ebenfalls wie oben.

7.4.4. Pepsinspaltung des unlöslichen Rückstands, Butanolextraktion

Der verbliebene Rückstand wird in 10^{-2} N HCl suspendiert, nach Proteinbestimmung (130-133 mg) wird 10 Gew. % Pepsin (13 mg) zugegeben und 24 h bei 25°C gerührt, 2.5 Gew. % Pepsin wird neu zugegeben und nochmals 16 h gerührt. Die dann klare Lösung wird zweimal mit je 100 ml 1-Butanol extrahiert, die Extrakte mit >95 % der verbliebenen Radioaktivität werden vereint und am Rotationsverdampfer bei 40°C getrocknet. Das radioaktive Peptidmaterial wird in 6 ml Butanol aufgenommen, für die Hochdruckflüssigkeitschromatographie durch ein Membranfilter (Sartorius) filtriert und auf ein kleineres Volumen eingengt.

7.4.5. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Das Säulenformat beträgt 0.4 x 25 cm, die Säule wird im Suspensionsverfahren gepackt. Der Puffer wird durch ein Membranfilter filtriert und i.V. entgast, 2-Propanol wird i.V. entgast.

Der Durchfluß beträgt konstant 2 ml/min. Startbedingungen sind 10 % 2-Propanol und 90 % 0.05 Ammoniumacetatpuffer, pH 4.0. Nach Injektion der Probe ($V_{\max} = 100 \mu\text{l}$), die maximal 40 nMol radioaktives Material enthält, wird ein linearer Gradient angelegt: Innerhalb von 30 min werden die Endbedingungen (90 % 2-Propanol- 10 % Ammoniumacetat, pH 4.0) erreicht, nach weiteren 4 min stellt das Gerät automatisch innerhalb von drei Minuten die Startbedingungen wieder her. Fraktionen à 2 ml werden aufgefangen und auf Radioaktivität untersucht.

7.4.6. Endgruppenanalyse, CPY-Reaktion, Dünnschichtchromatographie der Nebenkomponente

Die N- und C-terminale Analyse und die Nachreinigung des erst bei 2-Propanolkonzentration ≥ 75 % eluierten, kleineren Palmitylpeptides erfolgen wie früher für die Malonylpeptide beschrieben (7.3.11., 7.3.13., 7.3.15.)

7.4.7. Festphasenendmanabbau

7.4.7.1. Reinigung der Lösungsmittel

Die Reinigung der verwendeten Lösungsmittel von allen nucleophilen Verunreinigungen ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Kopplung: Dimethylformamid (DMF) wird wöchentlich über P_2O_5 i.V. destilliert und unter N_2 gelagert. Pyridin (2.5 l) wird mit Ninhydrin (5 g) 1 h unter Rückfluß gekocht und über eine Kolonne destilliert. Wiederholung nach drei Monaten. N-Äthylmorpholin wird wie Pyridin, jedoch wöchentlich gereinigt und unter N_2 gelagert.

7.4.7.2. Vorbereitung des Harzes (105)

40 mg Aminopolystyrol wird in einem spitzen Zentrifugenglas mit 1 ml 1 M Pyridin·HCl, pH 5.0 10 min gewaschen (Violett-färbung). Nach Zentrifugation wird der Überstand verworfen, das sehr feine Harz erneut je zwei Minuten unter Rühren mit 2 x 8 ml bidest. H₂O und 3 x 1 ml DMF gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wird der Überstand besonders sorgfältig entfernt.

7.4.7.3. Ankopplung (105)

Das trockene Peptid (70 nMol, lange lyophilisiert, um Ammoniumacetat zu entfernen) wird mit 50 µl 1 M Pyridin HCl, pH 5.0, versetzt und diese Lösung zum vorbereiteten Aminopolystyrolharz gegeben. Das Peptidgefäß wird mit 200 µl DMF gespült und das DMF ebenfalls zum Harz gegeben. 2 mg 1-Äthyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (EDC), frisch gelöst in 20 µl H₂O/DMF (1:1), werden zugefügt. Die Kupplung erfolgt unter Rühren bei 30° C in 3 h. Nach Zentrifugation wird das Harz mit 2 x 1 ml DMF gewaschen und die Menge gebundenen Peptids durch Radioaktivitätsdifferenzmessung bestimmt (~50 nMol).

7.4.7.4. Blockierung überschüssiger Aminogruppen des Trägers (106)

900 µl DMF, 120 µl N-Äthylmorpholin und 60 µl PITC wird zugegeben, 1 h bei 30° C unter N₂ gerührt, zentrifugiert und der Vorgang wiederholt. Dann wird mit DMF und Methanol ausgiebig gewaschen.

7.4.7.5. Edman-Abbau unter wasserfreien Bedingungen

Der Abbau erfolgt effizienter in rein organischen (106) als in wasserhaltigen Systemen und wird in einem auf 40° C thermostabilisierten, mit 2 Fritten verschlossenen Gefäß (s. Abb. 46) vorgenommen.



Abb. 46: Reaktionsgefäß für den Festphasenedmanabbau nach (182)

1. Kupplung: Zugabe von 1 ml eines Gemischs von PITC:DMF:N-Äthylmorpholin (1:15:2), 40 min, Verdrängung mit N_2 , Wiederholung für 20 min.
2. Waschen: 7 x abwechselnd mit je 5 ml Methanol und Dichloräthan, 45 min., Verdrängung immer mit N_2 .
3. Spaltung: Zugabe von 800 μ l Trifluoressigsäure, 15 min., Verdrängung mit N_2 in ein Schliffglas, Wiederholung für 2 min., Waschen mit 4 x 400 μ l Methanol.

Trifluoressigsäure und Methanol werden vereint, mit N_2 verblasen. Umlagerung wie früher (Kapitel 7.3.18.). Dann wieder Kupplung.

Zeitbedarf: 4-5 Zyklen können pro Tag durchgeführt werden.

7.4.8. Identifizierung

Die Sequenzamino-säuren des Festphasenabbaus werden nach den früher (7.3.19,20.) angegebenen Verfahren identifiziert. Die Prüfung auf Histidin (wässrige Phase) erfolgt nach Pauly (107). Die Massenspektren wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Schäfer aufgenommen.

7.5. Versuchsbeschreibung zu Kapitel 5

7.5.1. Erschöpfende chemische Modifizierung

- allgemeines Verfahren (s. Abb. 32)

7.5.1.1. Denaturierung - Reduktion

Die Proteinlösungen (60 µg/ml bis 20 mg/ml) werden in zwei Volumina Denaturierungspuffer gegossen:

7 M Guanidin HCl, 0.7 M Triäthanolamin-HCl, pH 8.4 (mit NaOH), 0.12 M 2-Mercaptoäthanol, in dem sie mindestens 30 min. bei 40° C reduziert werden.

7.5.1.2. Carboxymethylierung (s. 7.3.2.): zu 600 µl der reduzierten Probe wird 50 µl einer Lösung von 0.268 g Jodessigsäure in 1 ml 1 N NaOH gegeben. Der pH-Wert wird durch gelegentliche Zugabe von NaOH > 8.0 gehalten (15 min.).

7.5.1.3. Citraconylierung: Zu 600 µl des Ansatzes wird 60 µl einer Mischung von Citraconsäureanhydrid in Tetrahydrofuran (1:1) in 10 Aliquoten in 10 min. bei 0° C unter Schütteln zugegeben, der pH-Wert durch 9-11 x 60 µl 1 N NaOH bei 8.2 gehalten (Glaselektrode). Nach weiteren 20 min. erfolgt die Dialyse.

7.5.1.4. Bestimmung freier NH₂- und SH-Gruppen

Zur Homogenitätsprüfung nach chemischer Modifizierung wird ein entsprechend vergrößerter Ansatz (400 µl FSS Lösung, 12 mg; 800 µl Denaturierungspuffer) wie oben angegeben carboxymethy-

liert und citraconyliert und Protein durch Chromatographie an Sephadex G 50 von Reagenzien befreit. Freie NH_2 -Gruppen werden nach Habeeb (118), freie SH-Gruppen nach Elman (44) bestimmt.

Kontrolle: Mit gleichen Mengen nativer FSS.

7.5.2. Radioaktive Markierung der Transferasen und der Untereinheit α

Für die Lokalisierungsstudien wird FSS (20 mg/ml) in allen Fällen in 0.1 M KPO_4 , pH 6.5, 2 h bei 25° C mit 10^{-3} M DTNB vorinkubiert.

7.5.2.1. $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA-Inkubation

Ein Aliquot dieser FSS Lösung (10 mg/ml) wird bei 0° C 8 min. mit 10^{-3} M $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA (spez. Radioaktivität 44.1 mCi/mMol) inkubiert. Die Reaktion wird durch Eingießen in zwei Volumina Denaturierungslösung beendet: Diese enthält 7 M Guanidin HCl, 0.7 M Triäthanolamin HCl, 2.5×10^{-3} M DTNB, pH 8.2 (mit NaOH). Die Proben bleiben vor der Citraconylierung 15 min. bei Raumtemperatur.

7.5.2.2. $3\text{-}^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA-Inkubation

DTNB-behandelte FSS (20.3 mg/ml) wird mit 1.1×10^{-4} M $3\text{-}^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA (29 mCi/mMol) 30 min. bei 0° C inkubiert und wie oben denaturiert.

7.5.2.3. $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Palmityl-CoA-Inkubation

DTNB-behandelte FSS (13 mg/ml) wird mit 7×10^{-5} M $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Palmityl-CoA (60 mCi/mMol) 15 min. bei 0° C inkubiert und wie oben denaturiert.

7.5.2.4. Markierung der Untereinheit α

Die spezifische Markierung der α -Kette mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Jodacetamid wird nach Kresze (61) durchgeführt. $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Carboxamidomethyl-FSS (9 mg/ml) wird dann entweder (Schritt 3 vor Schritt 2, Abb. 32), mit DTNB wie oben inkubiert und denaturiert oder (Schritt 3 nach Schritt 2) mit DTNB freier Denaturierungslösung

behandelt und nach dem allgemeinen Verfahren chemisch modifiziert.

7.5.3. Erschöpfende chemische Modifizierung - spezielles Verfahren

Citraconylierung: 600 μ l der radioaktiven Proben werden wie in 7.5.1. citraconyliert, erst dann reduziert und carboxymethyliert (s. 7.3.2. und (162)): Für 900 μ l Probe wird 8 μ l Mercaptoäthanol (30 min., 40° C) und 75 μ l Jodessigsäurelösung (0.268 g/l ml 1 N NaOH; 15 min. pH 8.4 - 8.0) verwendet.

7.5.4. Dialyse-Harnstoffgelelektrophorese

7.5.4.1. Dialyse

Die nach dem allgemeinen oder speziellen Verfahren modifizierten Proben werden gegen 500 Volumina Elektrophoresepuffer (s. 7.5.4.2.), der 6 M Harnstoff enthält, mindestens 2 h bei 25° C unter magnetischem Rühren dialysiert. Die Proben (5-30 μ g, 5-300 μ l) werden dann der Gelelektrophorese unterworfen.

7.5.4.2. Gelelektrophorese

Gelgröße 4 x 60 mm.

Gele enthalten 3.4 bis 10 % Acrylamid, 0.1 % bis 0.3 % BIS, 0.023 % Temed und 6 M Harnstoff. Elektrophoresepuffer aus Gelsystem 1 (176); Laufzeit 1-3 h, 200-250 V, stabilisiert, 4° C.

Die Gele werden in einer Lösung von 0.25 % Coomassie G-250 in H₂O/Methanol/Eisessig (40:50:10) 45-60 min. angefärbt und in H₂O/Methanol/Eisessig (83:10:7) über Nacht entfärbt. Die in den Lokalisierungsstudien verwendeten Gele werden dann mit einer Rasierklinge in 14-20 gleichgroße Scheiben geschnitten und die Radioaktivität der Scheiben bestimmt (s.7.1.4.2.).

7.6. Versuchsbeschreibung zu Kapitel 6

7.6.1. Beladung mit 2.3- ^{14}C -NEM

In einem Reagenzglas bei $T = 0^\circ \text{C}$ werden 49 mg FSS (1680 mE/mg) in $V = 2.6 \text{ ml } 0.1 \text{ M KPO}_4$, pH 6.5 mit $5 \times 10^{-4} \text{ M } ^{14}\text{C}$ -NEM (2200 cpm/nMol) versetzt. Zu variablen Zeiten (0.5-90 min.) werden 200 μl Aliquote in 50 μl 1 M Cysteinlösung, pH 7.0 pipettiert. Nach 15 min. wird die FSS-Aktivität eines Aliquots bestimmt, der Rest mit 1 ml 0.3 M TCA gefällt und noch fünfmal mit TCA gewaschen. Kontrollansätze, in denen NEM mit Cystein vor Zugabe von FSS inkubiert wird, zeigen, daß NEM innerhalb weniger Sekunden durch Cystein inaktiviert wird und daß das Produkt von FSS durch Waschen vollständig abgetrennt wird.

Alternativ zur Abtrennung von NEM durch Fällung und Waschung kann diese durch Gelfiltration erfolgen.

7.6.2. Messung der Gleichgewichtskonstante

FSS (ca. 15 mg/ml) wird 90 min. bei 0°C mit $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ NEM vorinkubiert, die Reaktion wird durch Zugabe von frisch bereiteter, neutraler Cysteinlösung (Endkonzentration 0.2 M) gestoppt.

Reagenzien werden entweder durch Ammoniumsulfatfällung, gefolgt von einer Gelfiltration über Sephadex G 25 entfernt, oder durch Ultrazentrifugation (15 h, 27 000 Upm). Die Restaktivität des modifizierten Proteins ist unter 5 % des Ausgangswertes.

Die Inkubation mit ^{14}C -Malonyl-CoA und gegebenenfalls Coenzym A erfolgt in 0.1 M KPO_4 , pH 6.5, $V = 200 \mu\text{l}$ über 15 min. Das Gleichgewicht wird durch Zugabe von 1 ml 0.3 M TCA "eingefroren", das ausgefallene Protein wird mit 5 x 1 ml 0.3 M TCA gewaschen. Die Waschflüssigkeiten werden quantitativ in einem 10 ml Meßkolben gesammelt und die Radioaktivität bestimmt. Außerdem wird die Radioaktivität des Proteinniederschlags im Soluene-Dimilume-System bestimmt. Auswertung: s. Allgemeiner Teil.

7.6.3. Modifizierungsreaktion

Die β -Ketoacylreduktase wird nach (9), die Enoylreduktase nach (25) gemessen. Die Acetyltransferase und die Malonyltransferase wird nach (157), die Dehydratase nach (177) bestimmt.

7.6.3.1. Reaktion mit Phenylglyoxal (161)

In $V = 200 \mu\text{l}$ 0.2 M KPO_4 , pH 7.5 wird FSS (2.5 mg, 2400 mE/mg) mit 10^{-3} M Phenylglyoxal bei 0°C inkubiert. Nach variablen Zeiten wird die Gesamtreaktion, nach 3 h die Teilreaktion gemessen.

7.6.3.2. Reaktion mit TPCK, ZPCK, TLCK (136)

TLCK und ZPCK werden zu einer Endkonzentration von 10^{-2} M in Äthanol gelöst, TLCK (10^{-2} M) in 0.1 M KPO_4 , pH 6.5 gelöst. In einem Reagenzglas befinden sich: 1 mg FSS, 0.1 M KPO_4 , pH 6.5 ad $950 \mu\text{l}$. Start erfolgt bei 0°C mit $50 \mu\text{l}$ Reagenzlösung ($5 \times 10^{-4} \text{ M}$), bzw. in Kontrollansätzen mit $50 \mu\text{l}$ 0.1 M KPO_4 , pH 6.5 oder $50 \mu\text{l}$ Äthanol. Nach 30 und 70 min. wird die Gesamtreaktion im FSS-Test gemessen.

7.6.3.3. Photooxidation (in Anlehnung an 178)

In eine Quarzküvette wird pipettiert: 1 mg FSS und 0.1 M KPO_4 , pH 8.5. In einem abgedunkelten Raum wird die Küvette im Küvettenhalter des Fluorimeters auf 25°C thermostatisiert und reiner Sauerstoff in langsamem Strom durch die Lösung geleitet. Die Reaktion wird durch Belichten mit dem weißen Licht des Fluorimeters gestartet (Spaltbreite 40 nm). Kontrollansätze, die nicht belichtet werden, zeigen keine Inaktivierung.

7.6.3.4. Lactoperoxidasereaktion (140)

In $V = 1 \text{ ml}$ 0.05 M KPO_4 , pH 7.5 befinden sich 8.1 mg FSS, $5 \times 10^{-4} \text{ M EDTA}$, $2 \times 10^{-4} \text{ M KJ}$, $0.4 \mu\text{g LPO}$. Gestartet wird

durch Zugabe von 10^{-4} M H_2O_2 , nach 10 min. bei 25° C wird ein Aliquot geeignet verdünnt und getestet. Dann wird erneut KJ und H_2O_2 (Mengen wie oben) zugegeben, 10 min. inkubiert und getestet. Die H_2O_2 -Konzentration bleibt in diesem Verfahren immer sehr gering. Kontrollen enthalten KJ und H_2O_2 , jedoch keine LPO bzw. KJ und LPO, jedoch kein H_2O_2 und werden nicht inaktiviert.

8. Zusammenfassung

Für die Aufnahme von Substraten aus dem Medium auf 4'-Phosphopantethein und für die Abgabe von Endprodukten von 4'-Phosphopantethein auf Coenzym A stehen dem Multienzymkomplex FSS aus Hefe spezifische Transferasen zur Verfügung.

Spezifische Beladungsexperimente zeigen, daß Acetyl-, Malonyl- und Palmityltransferase in je mindestens 4-5 identischen Kopien im Komplex vorhanden sind.

Diese Experimente sowie Kompetitionsstudien zeigen weiter, daß der Malonyltransfer durch Palmityl-CoA gehemmt wird, und daß umgekehrt der Palmityltransfer durch Malonyl-CoA verhindert wird, daß also eine enge funktionelle Beziehung zwischen diesen Transferasen besteht. Demgegenüber ist die Acetyltransferase von Malonyl- und Palmityltransferase offensichtlich weitgehend unabhängig.

Zur Definition der chemischen Umgebung der Akzeptorgruppe für Malonylreste im aktiven Zentrum der Malonyltransferase und für Palmitylreste im aktiven Zentrum der Palmityltransferase wird das jeweilige Teilenzym im Komplex mit radioaktiver Malonsäure bzw. Palmitinsäure markiert und das Protein enzymatisch verdaut. ^{14}C -Malonylpeptidmaterial wird nach konventionellen Anreicherungsverfahren isoliert und durch Kombination mehrerer Verfahren sequenziert. ^{14}C -Palmitylpeptidmaterial wird im

wesentlichen hochdruckflüssigkeitschromatographisch rein dargestellt und durch Festphasenendmanabbau sequenziert.

Acylakzeptoraminosäure beider Transferasen ist die Aminosäure Serin. Der Vergleich der Sequenzen der Malonylbindungsstelle und der Palmitylbindungsstelle lehrt, daß die chemische Umgebung der Acylakzeptoraminosäure in beiden Fällen identisch ist, was unter Berücksichtigung der Kompetitionsstudien und in Einklang mit anderen Ergebnissen als Beweis für die Identität der Malonyl- und Palmityltransferase gewertet wird.

Mit Hilfe eines neuentwickelten, hochauflösenden Systems zur Trennung von Proteinuntereinheiten gelingt die analytische Auftrennung der Untereinheiten α und β von FSS, sowie die proteinchemische Lokalisierung der Malonyl-Palmityl-Transferase und der Acetyltransferase auf der Polypeptidkette β . Eine allgemeine Anwendung des Verfahrens wird beschrieben.

Gleichgewichtsmessungen zeigen, daß die Besetzung der Malonyl-Palmityl-Transferase durch Malonylreste ausgehend von Malonyl-CoA endergon verläuft. Angesichts der vermuteten abschirmenden und regulatorischen Funktion der Transferase läßt sich dies als biologisch sinnvoll deuten.

9. Literaturverzeichnis

1. Lynen, F., Oesterheld, D., Schweizer, E. und Willecke, K. (1968). Cellular Compartmentalization and Control of Fatty Acid Metabolism (Gran, F.C. ed.), 1-24, Universitetsforlaget Oslo
2. Bloch, K. und Vance, D. (1977). Ann Rev. Biochem. 46: 263-298
3. Volpe, J.J. und Vagelos, P.R. (1973). Ann Rev. Biochem. 42: 21-60
4. Wakil, S.J. (1970). Lipid Metabolism, 1-48, Academic Press, New York
5. Katiyar, S.S. und Porter, J.W. (1977). Life Sciences 20: 737-760
6. Knoche, H.W. und Koths, K.E. (1973). J. Biol. Chem. 10: 3517-3519
7. Vance, D.E., Mitsuhashi, O. und Bloch, K. (1972). J. Biol. Chem. 7: 2303-2309
8. Lynen, F. (1960). Sitzungsbericht d. Bayer. Akad. Wiss., 8-10
9. Lynen, F. (1961). Fed. Proc. 20: 941-951
10. Sumper, M. (1970). Dissertation Universität München
11. Lynen, F. (1976). Vortrag auf der Jahrestagung der Ges. f. Biol. Chemie, München
12. Sedgwick, B. und Cornforth, J.W. (1977). Eur. J. Biochem. 75: 465-479
13. Sedgwick, B., Cornforth, J.W., French, S.J., Gray, R.T., Kelstrup, E. und Willadsen, P. (1977). Eur. J. Biochem. 75: 481-495
14. Buckner, J.S. und Kolattukudy, P.E. (1976). Biochemistry 15: 1948-1957
15. Schreckenbach, Th. (1975). Dissertation Universität München
16. Majerus, P.W., Alberts, A.W. und Vagelos, P.R. (1965). J. Biol. Chem. 240: 4723-4726
17. Roncari, D.W.K., Bradshao, R.A. und Vagelos, P.R. (1972). J. Biol. Chem. 247: 6234-6242

18. Schweizer, E., Kniep, B. Castorph, H. und Holzner, U.
(1973). Eur. J. Biochem. 39: 353-362
19. Kirschner, K. und Bisswanger, H. (1976). Ann. Rev.
Biochem. 45: 143-166
20. Brady, R.O. und Gurin, S. (1950). J. Biol. Chem.
186: 461-469
21. Lynen, F. (1959). J. Cell. Comp. Physiol. 54, Suppl. 1:
33-49
22. Brady, R.O. (1958). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 44:
993-998
23. Wakil, S.J. (1958). J. Am. Chem. Soc. 80: 6465
24. Lynen, F. (1973). Proc. 3rd Intern. Spec. Symp. on
Yeasts, Otaniemi, II, 7-29
25. Hagen, A. (1963). Dissertation Universität München
26. Alberts, A.W., Goldman, P. und Vagelos, P.R. (1963).
J. Biol. Chem. 238: 557-586
27. Brodie, J.D., Wasson, G.W. und Porter, J.W. (1963).
Biochem. Biophys. Res. Comm. 12: 27-33
28. Williamson, I.P. und Wakil, S.J. (1966). J. Biol. Chem.
241: 2326-2332
29. Schweizer, E., Piccinini, F., Duba, C., Günther, S.,
Ritter, E., und Lynen, F. (1970). Eur. J. Biochem.
15: 483-499
30. Joshi, V.C. und Wakil, S.J. (1971). Arch. Biochem.
Biophys. 143: 493-505
31. Ruch, F.E. und Vagelos, P.R. (1973). J. Biol. Chem.
248: 8095-8106
32. Joshi, V.C., Plate, C.A. und Wakil, S.J. (1970).
J. Biol. Chem. 245: 2857-2867
33. Phillips, G.T., Nixon, J.E., Dorsey, J.A., Butterworth,
P.H.W., Chesterton, C.J. und Porter, J.W. (1970).
Arch. Biochem. Biophys. 138: 380-391
34. Ziegenhorn, J. (1970). Dissertation Universität München
35. Barnes, E.M. und Wakil, S.J. (1968). J. Biol. Chem. 243:
2955-2962
36. Barnes, E.M., Swindell, A.C. und Wakil, S.J. (1970).
J. Biol. Chem. 245: 3122-3128

37. Shine, W.E., Mancha, M. und Stump, P.K. (1976).
Arch. Biochem. Biophys. 172: 110-116
38. Kumar, S. (1975). J. Biol. Chem. 250: 5150-5158
39. Kolattukudy, P.E., Buckner, J.S. und Bedord, C.J.
(1976). Biochem. Biophys. Res. Comm. 68: 379-386
40. Bloch, K. (1977). Adv. Enzymol. 45: 1-84
41. Ayling, J. (1972). Biochemistry 11: 526-533
42. Schreckenbach, Th. (1977). Eur. J. Biochem. 80: 13-23
43. Oesterhelt, D. (1976). Dissertation Universität München
44. Ellman, G.L. (1959). Arch. Biochem. Biophys. 82: 70-77
45. Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, Th., Czied, R.,
Carbade, K.H., Meyer-Ahrendt, E., Pfeleiderer, E. und
G. (1953). Z. f. Naturf. 8b: 555-577
46. Engeser, H. (1975). Diplomarbeit Universität München
47. Zahler, W.L., Barden, R.E. und Cleland, W.W. (1968).
Biochim. Biophys. Acta 164: 1-11
48. Weber, K. und Kuter, D.J. (1971). J. Biol. Chem. 246:
4504-4509
49. Lenard, J. (1971). Biochem. Biophys. Res. Comm. 45:
662-668
50. Schweizer, E., Lerch, E., Kroeplin-Rueff, L. und Lynen,
F. (1970). Eur. J. Biochem. 15: 472-482
51. Collier, H.B. (1973). Anal. Biochem. 56: 310-311
52. Ziegenhorn, J., Niedermeier, R., Nüssler, C. und Lynen
F. (1972). Eur. J. Biochem. 30: 285-300
53. Hirs, C.H.W. (1967). Meth. Enzymology XI (Hirs, C.H.W.,
ed.) Academic Press, New York and London, 199-203
54. Michl, M. (1958). J. Chromatography 1: 93-121
55. Wieland, T. und Pfeleiderer, G. (1955). Ang. Chem. 67:
257-260
56. High Voltage Electrophoresis Guide, Savant Instruments,
Hicksville, USA
57. Roth, M. (1971). Anal. Chemistry 43: 880-882
58. Benson, J.R. und Hare, P.E. (1975). Proc. Natl. Ac. Sci.
US. 72: 619-622

59. Kresze, G.B., Steber, L, Oesterheldt, D. und Lynen, F.
(1977). Eur. J. Biochem. 79: 181-190
60. Schwietz, H., Dietlein, G., Schiltz, E. und Schweizer,
E. (1976). Biochim. Biophys. Acta 453: 453-458
61. Kresze, G.B. (1976). Dissertation Universität München
62. Keil, B. (1971). In "The Enzymes (Boyer, P.D., ed.)
III. Academic Press, New York and London, 250-275
63. Hartley, B.S. (1970). Biochem. J. 119: 805-822
64. Gray, W.R. (1972). Methods Enzym. XXV, B (Hirs, C.H.W.,
Timasheff, S.N., eds.), Academic Press, New York
and London, 121-138
65. Tamura, Z., Nakajima, T., Nakayama, T., Pisano, J.J.
und Udenfriend, S. (1973). Anal. Biochem. 52:
595-606
66. Edman, P. (1949). Arch. Biochem. Biophys. 22: 475-476
67. Edman, P. und Henschen, A. (1975). In "Protein Sequence
Determination (Needleman, S.B., ed.). Springer-Ver-
lag, Berlin, 232-279
68. Ambler, R.P. (1972). Methods in Enzym. XXV, B (Hirs,
C.H.W. und Timasheff, S.N., eds.). Academic Press,
New York and London, 262-272
69. Zuber, H. (1968). Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.
349: 1337-1352
70. Hayashi, R., Moore, S. und Stein, W.H. (1973).
J. Biol. Chem. 248: 2296-2302
71. Matsuhara, H. (1970). Methods Enzym. XIX (Perlmann,
G.E. und Lorand, L., eds.), Academic Press, New York
and London, 642-652
72. Perham, R.N. und Harris, I. (1974). EMBO Course on Protein
Sequence Analysis, Cambridge, Skriptum
73. Henschen, A., Kühn, K. und Edman, P. (.976). EMBO Protein
Sequencing Course, München, Skriptum
74. Petersen, J.D., Nehrlich, S., Oyer, P.E. und Steiner,
D. F. (1972). J. Biol. Chem. 247: 4866-4871
75. Edman, P. und Begg, G. (1967). Eur. J. Biochem. 1:
80-91
76. Smithies, O., Gibson, D., Fanning, E.M., Goodfliesh,
R.M., Gilman, J.G. und Ballantyne, D.L. (1971).
Biochemistry 10: 4912-4921

77. Houmard, J. und Drapeau, G.R. (1972). Proc. Natl. Ac. Sci. US. 69: 3506-3509
78. Heiland, I., Brauer, D. und Wittmann-Liebold, B. (1976). Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 357: 1751-1770
79. Jacobs, J.W., Kemper, B., Niall, H.D., Habener, J.F. und Potts, J.T. (1974). Nature 249: 155-157
80. Henning, R., Milner, R.J., Reske, K., Cunningham, B.A. und Edelman, G.M. (1976). Proc. Natl. Ac. Sci. US. 73: 118-122
81. Silver, J. und Hood, L. (1976). Proc. Natl. Ac. Sci. US. 73: 599-603
82. Silver, J. und Hood, L. (1974). Anal. Biochem. 60: 285-292
83. Weiner, A.M., Platt, T. und Weber, K. (1972). J. Biol. Chem. 247: 3242-3251
84. Dayhoff, M.O. (1972). Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol. 5, Natl. Biomed. Res. Found., Washington
85. Josefson, L. und Edman, P. (1957). Biochim. Biophys. Acta 25: 614-623
86. Josefson, L. (1963). Biochim. Biophys. Acta 74: 774-775
87. Bruice, T.C. und Benkovic, S.J. (1966). Bioorganic Mechanisms, Vol. I, Benjamin Inc., New York
88. Hess, S. (1976). Dissertation Universität München
89. Knobling, A., Schiffmann, D., Sickinger, H.-D. und Schweizer, E. (1975). Eur. J. Biochem. 56: 359-367
90. Engelhardt, H. (1977). Hochdruckflüssigkeitschromatographie, 2. Ausgabe, Springer-Verlag, Berlin
91. Telepchak, M.J. (1973). Chromatographia 6: 234-236
92. Kirkland, J.J. (1971). J. Chromatogr. Sci. 9: 206-214
93. Gil-Av., E. (1974). Round Table Discussion. In: "Peptides 1974" (Wolman, Y., ed.). J. Wiley and Sons, New York, 246-256
94. Yoshida, N., Zimmerman, C.L. und Pisano, J.J. (1975). In "Peptides: Chemistry, Structure and Biology" (Walter, R. und Meienhofer, J., ed.). Ann Arbor Sciences, Ann Arbor, 955-965

95. Gruber, K.A., Stein, S., Brink, L., Radhakrishnan, A. und Udenfriend, S. (1976). Proc. Natl. Ac. Sci. US. 73: 1314-1318
96. Burgus, R. und Rivier, J. (1976). In "Peptides 1976", Proc. 14th Eur. Peptide Symp., Wépion (Loffet, A., ed.), Editions de L'Université de Bruxelles, 85-94
97. Hansen, J.J., Greibrokk, T., Currie, B.L., Johansson, N.-G. und Folkers, K. (1977). J. Chromatogr. 135: 155-164
98. Laursen, R.A. (1971). Eur. J. Biochem. 20: 89-102
99. Laursen, R.A., Bonner, A.G. und Horn, M.J. (1975). In "Instrumentation in Amino Acid Sequence Analysis" (Perham, R.N., ed.), Academic Press, London
100. Solid-Phase Methods in Protein Sequence Analysis (1975). Proc. 1st Intern. Conf. (Laursen, R.A., ed.), Pierce Chemical Company, Rockford
101. Laursen, R.A., Horn, M.J. und Bonner, A.G. (1972). FEBS Letters 21: 67-70
102. Horn, M.J. und Laursen, R.A. (1973). FEBS Letters 36: 285-288
103. Wachter, E., Machleidt, W., Hofner, H. und Otto, J. (1973). FEBS Letters, 35: 97-102
104. Wachter, E., persönliche Mitteilung
105. Wittmann-Liebold, B., persönliche Mitteilung
106. Previero, A., Derancourt, J., Coletti-Previero, M.-A., (1973). FEBS Letters 33: 135-138
107. Easley, C.W. (1965). Biochim. Biophys. Acta 107: 386-388
108. Grauvogl, M. (1977). Diplomarbeit, Universität München
109. Yalpani, M., Willecke, K. und Lynen, F. (1969). Eur. J. Biochem. 8: 495-502
110. Schweizer, E. (1977), persönliche Mitteilung
111. Pirson, W. (1970). Dissertation, Universität München
112. Lust, G. und Lynen, F. (1968). Eur. J. Biochem. 7: 68-72
113. Agradi, E., Libertini, L. und Smith, S. (1976). Biochem. Biophys. Res. Comm. 68: 894-900
114. Gross, E. und Witkop, B. (1962). J. Biol. Chem. 237: 1856-1860

115. Butler, P.J.G., Harris, J.I., Hartley, B.S. und Leberman, R. (1969). *Biochem. J.* 112: 679-689
116. Dixon, H.B.F. und Perham, R.N. (1968). *Biochem. J.* 109: 312-314
117. Atassi, M.Z., Habeeb, A.F.S.A. (1972). *Methods Enzym.* XXV, B (Hirs, C.H.W. und Timasheff, S.N., eds.) Academic Press, New York and London, 546-553
118. Habeeb, A.F.S.A. (1966). *Anal. Biochem.* 14: 328-336
119. Gurd, F.R.N. (1967). *Methods Enzym.* XI (Hirs, C.H.W., ed.), Academic Press, New York and London, 532-541
120. Oesterhelt, D., Bauer, H., Kresze, G.-B., Steber, L. und Lynen, F. (1977). *Eur. J. Biochem.* 79: 173-180
121. Kresze, G.-B., Oesterhelt, D., Lynen, F., Castorph, H. und Schweizer, E. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 69: 893-899
122. Wieland, F., persönliche Mitteilung
123. Zillig, W., persönliche Mitteilung
124. Spieß, J. (1976). Dissertation, Universität München
125. Friedrich, J., persönliche Mitteilung
126. Fietzek, P.P. und Kühn, K. (1976). In: *Int. Rev. Conn. Tiss. Res.*, Vol. 7 (Hall, D.A. und Jackson, D.S., eds.) Academic Press, New York, 1-60
127. Müller, P., persönliche Mitteilung
128. Darnall, D.W. und Klotz, I.M. (1972). *Arch. Biochem. Biophys.* 149: 1-14
129. Henschen-Edman, A., persönliche Mitteilung
130. Kresze, G.-B., persönliche Mitteilung
131. Oesterhelt, D., Bauer, H. und Lynen, F. (1969). *Proc. Natl. Ac. Sci. US.* 63: 1377-1382
132. Austen, B.M. und Smith, E.L. (1976). *J. Biol. Chem.* 251: 5835-5837
133. Kantrowitz, E.R. und Lipscomb, W.N. (1976). *J. Biol. Chem.* 251: 2688-2695
134. Kantrowitz, E.R. und Lipscomb, W.N. (1977). *J. Biol. Chem.* 251: 2873-2880

135. Malcolm, A.D.B. und Coggins, J.R. (1976). Ann. Reports, B, 73: 360-374, The Chemical Society, London
136. Shaw, E. (1967). In: Methods Enzym. XI (Hirs, C.H.W., ed.), Academic Press, New York and London, 677-686
137. Westhead, E.W. (1965). Biochemistry 4: 2139-2144
138. Westhead, E.W. (1972). In: Methods Enzym. XXV (Hirs, C.H.W. und Timasheff, S.N., eds.). Academic Press, New York and London, 401-409
139. Taylor, M.B. und Radda, G.K. (1971). In: Methods Enzym. XVIII, B (McCormick, D.B. und Wright, L.B., eds.), Academic Press, New York and London, 496-506
140. Bayse, G., Michaels, A. und Morrison, M. (1972). Biochim. Biophys. Acta 284: 30-33
141. Riordan, J.F. und Vallee, B.L. (1967). Methods Enzym. XI. (Hirs, C.H.W., ed.). Academic Press, New York and London, 565-570
142. Riordan, J.F. und Vallee, B.L. (1972). In: Methods Enzym. XXV, B (Hirs, C.H.W. und Timasheff, S.M., eds.). Academic Press, New York and London, 515-521
143. Allen, G. und Harris, J.I. (1976). Biochem. J. 155: 523-534
144. Pétra, P.H. (1971). Biochemistry 10: 3163-3170
145. Pétra, P.H. und Neuratz, H. (1971). ibid. 3171-3177
146. Ochoa, S. (1955). In: Methods Enzym. I (Colowick, S.P. und Kaplan, N.O., eds.). Academic Press, New York, 688
147. Buckel, W. und Eggerer, H. (1965). Biochem. Z. 343: 29-43
148. Kester, W.R. und Matthews (1977). J. Biol. Chem. 252: 7704-7710
149. Eggerer, H. und Lynen, F. (1962). Biochem. Z. 335: 540-547
150. Ziegenhorn, J. und Lynen, F. (1974). In: Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., ed.), 3. Aufl. Verlag Chemie, Weinheim, 2083-2086
151. Seubert, W. (1960). Biochem. Prep. 7: 80-83
152. Warburg, O. und Christian, W. (1942). Biochem. Z. 310: 384-421

153. Turner, J.C., Review 6, Amersham Buchler
154. Dyer, A. (1974). An Introduction to Liquid Scintillation Counting, Heyden Verlag Rheine
155. Lynen, F. (1969). Meth. Enzym. XIV (Lowenstein, J.M., ed.). Academic Press, New York and London, 17-33
156. Higgins, M.J.P. und Kekwick, R.G.O. (1973). Biochem. J. 134: 295-310
157. Weithmann, K.U. (1974). Dissertation, Universität München
158. Michel, G. und Bergmeyer, H.U. (1974). In: Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., ed.), 3. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim, 2015-2036
159. Lynen, F. (1951). Liebigs Ann. Chem. 574: 33-37
160. Schäfer, W., persönliche Mitteilung
161. Means, G.E. und Feeney, R.E. (1971). Chemical Modification of Proteins, Holden-Day, Inc., San Francisco
162. Crestfield, A.M., Moore, S. und Stein, W.H. (1963). J. Biol. Chem. 238: 622-627
163. Sephadex-Gel Filtration in Theory and Practice (1971). Firmenschrift Pharmacia, Uppsala
164. Whatmann, Firmenschrift, Meidstone
165. Moore, S. und Stein, W.H. (1963). Meth. Enzym. VI (Colowick, S.P. und Kaplan, N.O., eds.), Academic Press, New York and London, 819-831
166. Blackburn, S. (1968). Amino Acid Determination, Marcel Dekker, Inc., New York
167. Benisek, W.F., Raftery, M.A. und Cole, R.D. (1967). Biochemistry 6: 3780-3790
168. Handbuch Firma Biotronik, Frankfurt
169. Hirs, C.H.W. (1967). In: Meth. Enzym. XI (Hirs, C.H.W., ed.). Academic Press, New York and London, 197-199
170. Narita, K., Matsuo, H. und Nakajima, T. (1975). In: Protein Seq. Det. (Needleman, S.B., ed.), 2nd ed., Springer-Verlag, Berlin, 30-103
171. Light, A. (1972). In: Meth. Enzym. XXV (Hirs, S.H.W. und Timasheff, S.N., eds.). Academic Press, New York and London, 253-262

172. Drapeau, G.R. (1976). In: Meth. Enzym. XLV, B. (Lorand, L., ed.). Academic Press, New York and London, 469-475
173. Habeeb, A.F.S.A., Cassidy, H.G. und Singer, S.J. (1958). Biochim. Biophys. Acta 29: 587-593
174. Frei, R.W., MacLellan, B.L. und MacNeil, J.D. (1973). Anal. Chim. Acta 66: 139-142
175. Bidleman, T.F., Nowlan, B. und Frei, R.W. (1972). Anal. Chim. Acta 60: 13
176. Maurer, H.R. (1968). Disc Elektrophorese. Walter de Gruyter, Berlin
177. Schmitt, Th. (1977). Dipolmarbeit, Universität München
178. Vogel, G. (1971). Dissertation, Universität München
179. Engeser, H., Wieland, F. und Lynen, F., (1977). FEBS Letters 82: 139-142
180. Laemmli, U.K. (1970). Nature 227: 680-685
181. Weber, K. und Osborn, M. (1969). J. Biol. Chem. 244: 4406-4412
182. Doolittle, L.R., Mross, G.A., Fothergill, L.A. und Doolittle, R.F. (1977). Anal. Biochem. 78: 491-505

LEBENS LAUF

Name: Hansjörg Engeser

Geburtsdatum: 4.1.1950

Geburtsort: Pforzheim

Eltern: Dr.med. Josef Engeser und Dr.med. Hildegard Engeser,
geb. Glamser

Schulbildung:

1956-1960 Nordstadtschule Pforzheim

1960-1968 Reuchlin-Gymnasium Pforzheim (altsprachlich)

Akademische Bildung:

1968-1971 Studium der Chemie an der Universität Heidelberg

1971-1974 Studium der Chemie an der Universität München,
Diplomhauptprüfung

Sept. 1974 -

Dez. 1977 Anfertigung der vorliegenden Arbeit unter An-
leitung von Herrn Professor Dr. F. Lynen am
Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

